

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

THESE PRESENTEE A
UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU GRADE DE PHILOSOPHIAE DOCTOR (BIOPHYSIQUE)

PAR
FRANCOIS LAMARCHE
B. SC. (BIOPHYSIQUE)

UNE APPROCHE PERMETTANT DE QUALIFIER ET DE QUANTIFIER LES
INTERACTIONS LIPIDE-PROTEINE ET CHLOROPHYLLE-PROTEINE A
L'INTERFACE AIR-EAU

JUILLET 1988

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

**A Thérèse et Jacques,
pour leur patience**

RESUME

Nous présentons une approche expérimentale qui permet de qualifier et de quantifier les interactions lipide-protéine, en particulier le système dioléoylphosphatidylcholine (PC(18:1))-cytochrome c (cyt c), et chlorophylle-protéine, plus particulièrement le système chlorophylle a (chl a)-cyt c, en utilisant la technique des monocouches à l'interface air-eau. Comparativement à la mesure classique des cinétiques d'accroissement de la pression de surface, la procédure que nous proposons présente l'avantage de minimiser la dénaturation de surface des protéines; processus effectif aux faibles pressions de surface. Cette approche consiste à soumettre le film mixte à des cycles expansion-compression originants de forte pression de surface. Afin de démontrer l'utilité de notre approche, nous avons caractérisé les isothermes de pression de surface (Π)-aire moléculaire (σ), de potentiel de surface (ΔV)- σ , de déphasage ellipsométrique ($\delta\Delta$)- σ et de radioactivité de surface (Γ)- σ des systèmes binaires PC(18:1)-cyt c et chl a-cyt c. Le cyt c peut s'incorporer réversiblement dans une monocouche de PC(18:1). La pression de surface assure la répartition de la protéine entre la sous-phase et la monocouche lipidique. Entre 0 et 14 mN m⁻¹, le cyt c est stabilisé dans la monocouche de PC(18:1), alors que la protéine est exclue du film pour des pressions comprises entre 14 et 23 mN m⁻¹. La réversibilité de l'incorporation produit une hystérèse dans les isothermes Π - σ , ΔV - σ , $\delta\Delta$ - σ et Γ - σ obtenues pour des cycles expansion-compression. A partir des isothermes Π - σ obtenues pour la PC(18:1), le cyt c et le mélange PC(18:1)-cyt c, nous estimons l'énergie de

stabilisation du cyt c dans la monocouche de PC à 250 J mole lipide (mol éq. résidus)⁻¹. L'applicabilité de la loi d'additivité dans l'estimation des potentiels de surface est caractéristique d'une faible interaction. L'incorporation du cyt c dans les monocouches de chl a est irréversible. Suite à la première expansion, qui permet de maximiser la quantité de protéine incorporée dans le film, la quantité de cyt c associée à chaque chl a demeure constante et ce peu importe la pression de surface. Suite à la première expansion, les isothermes obtenues lors de l'expansion et lors de la compression sont indiscernables, indiquant l'irréversibilité de l'incorporation. A cause du caractère irréversible de l'incorporation, il est impossible d'estimer l'énergie de stabilisation du cyt c dans une monocouche de chl a. La détermination des spectres d'absorption et de fluorescence du mélange chl a-cyt c suggèrent la dilution de la chl a par le cyt c. La loi d'additivité ne peut être appliquée à l'estimation des potentiels de surface de ce système, un exemple d'interaction forte. Afin d'étendre la portée de cette procédure de caractérisation des interactions lipide-protéine et chlorophylle-protéine, nous avons étudié de façon prospective les systèmes phosphatidylcholine (PC) bovine-cyt c, chl a-stellacyanine (scy), chl a-plastocyanine (pcy) et chl a-cytochrome f. (cyt f). D'une part, ces études nous permettent de mettre en évidence la dépendance ionique de l'incorporation du cyt c dans une monocouche de PC. D'autre part, il apparaît que les interactions chlorophylle-protéine sont spécifiques et que des facteurs tels la structure et la charge de surface des protéines peuvent moduler ces interactions. L'approche que nous décrivons peut être avantageusement appliquée à la qualification et la quantification des interactions de nombreux systèmes lipide-protéine rapportés dans la littérature.

REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement le Professeur Leblanc pour le support et la confiance qu'il m'a toujours manifestés. Plus particulièrement, je lui suis reconnaissant de m'avoir permis de réaliser tous mes projets, même les plus fous.

Je remercie également le Professeur Aghion du département de Botanique de l'Université de Liège de ses judicieux conseils et pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à l'été 1986. J'en garde un souvenir inoubliable.

En plus des Professeurs Leblanc et Aghion, je suis très reconnaissant envers les Professeurs Boucher et McIntosh du Centre de Recherche en Photobiophysique et le Professeur Phillips du Medical College of Pennsylvania pour avoir accepté de juger cette thèse.

Merci sincère au Dr A. English de l'Université Concordia pour m'avoir fourni les précieux échantillons de plastocyanine et de stellacyanine. Il y a également le Professeur Tancrède à qui je dois de nombreuses et stimulantes discussions. Merci à lui.

Je ne peux passer sous silence le support technique et les précieux conseils qui me furent prodigués par Messieurs P. Boivin, G. Munger, A. Tessier, du Centre de Recherche en Photobiophysique et par Monsieur G. Chartrand, du Centre de Formation d'Hydro-Québec. Un merci particulier aux magiciens de l'atelier de mécanique.

Finalement, je remercie chaleureusement tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidé à accomplir ce travail. Leur amitié m'est inestimable.

AVANT-PROPOS

Ce manuscrit constitue le fruit de six années d'efforts consacrées à mieux comprendre le comportement des lipides et des protéines organisés à l'interface air-eau. En plus, ce travail nous a permis d'identifier les forces et les faiblesses de la technique des monocouches comme modèle des membranes biologiques. C'est afin d'avoir des balises fiables que les systèmes traités dans le présent ouvrage sont relativement simples et que les mélanges étudiés s'éloignent des couples réellement rencontrés dans les membranes naturelles. Comme ce travail identifie assez clairement (du moins je le crois!) les limites d'application de cette technique, il devra s'en suivre l'étude de systèmes biologiques plus "réels". Je laisse ce travail à mes successeurs.

Je prie d'excuser les puristes de la langue française de l'usage de certains néologismes dans le présent ouvrage. Plus d'une fois je fus embêté par les termes que je devais employer afin de décrire les systèmes et leur comportement. De plus, dans certains cas, des variables possèdent des exposants et des indices superposés dans les équations, alors que ces mêmes indices et exposants se trouvent décalés dans le texte. Je prie le lecteur de m'en excuser mais il me fut techniquement impossible de faire autrement. J'espère que ces "inconvenients" n'alourdiront pas trop la lecture du présent ouvrage.

TABLE DES MATIERES

	Page
RESUME_____	i
REMERCIEMENTS_____	iii
AVANT-PROPOS_____	iv
TABLE DES MATIERES_____	v
LISTE DES TABLEAUX_____	xii
LISTE DES FIGURES_____	xiv
CHAPITRES	
1. Introduction_____	1
1.1. Les modèles de membranes biologiques_____	2
1.1.1. Le modèle de Gorter et Grentel_____	2
1.1.2. Le modèle de Danielli-Davson_____	4
1.1.3. Le modèle de Singer et Nicolson_____	5
1.2. Eléments relatifs à la structure des protéines_____	8
1.2.1. Les protéines hydrosolubles_____	8
1.2.2. Les protéines intégrales de membrane_____	8
1.2.3. Les protéines périphériques_____	9
1.3. Etude des interactions lipide-protéine à l'aide de la technique des monocouches_____	12
1.3.1. Stratégies d'étude des interactions lipide-protéine par la technique de monocouches_____	14
1.3.1.1. Les cinétiques d'accroissement de la pression de surface, les cinétiques d'accroissement de l'aire moléculaire_____	14

1.3.1.2. Influence de la pression de surface de la monocouche sur l'incorporation de la protéine_____	15
1.3.1.3. Identification des conditions maximisant l'incorporation des protéines dans les monocouches lipidiques_____	17
1.3.1.4. Mesure des isothermes de pression de surface-moléculaire des mélanges lipide-protéine_____	18
1.3.2. Activité de surface et incorporation des protéines dans les monocouches lipidiques_____	21
1.3.2.1. L'action des phospholipases sur les monocouches de lipide_____	21
1.3.2.2. Les systèmes lipide-cytochrome c_____	23
1.3.2.3. Les systèmes lipide-albumine sérique_____	28
1.3.2.4. Les systèmes lipide-colicine_____	29
1.3.2.5. Les systèmes lipide-anticorps antilipide_____	29
1.3.2.6. L'incorporation des protéines membranaires dans les monocouches de lipide_____	30
1.3.2.7. Un cas particulier d'interaction lipide-protéine: les systèmes chlorophylle-protéine_____	33
1.4. Forces et faiblesses de la technique des monocouches appliquée à l'étude des interactions lipide-protéine_____	35
1.5. Proposition d'une procédure permettant de qualifier et de quantifier les interactions lipide-protéine_____	38
2. Méthodes expérimentales_____	41
2.1. Pureté des produits utilisés_____	41

2.1.1. Pureté des produits servant à la préparation de la sous-phase	41
2.1.2. Préparation des protéines	42
2.1.2.1. Méthylation du cytochrome c	45
2.1.3. Pureté des lipides, de la chlorophylle <u>a</u> et de l'acide octadécanoïque	45
2.2. Purification du NaCl pour son utilisation en monocouche	50
2.2.1. Le rinçage aux solvants organiques	51
2.2.2. La précipitation au HCl(g)	53
2.2.3. L'extraction au chloroforme	54
2.2.4. Confrontation des méthodes de purification du NaCl	55
2.3. La technique des monocouches	56
2.3.1. Généralités relatives à la technique	57
2.3.2. La déposition des films monomoléculaires	61
2.3.3. La pression de surface	62
2.3.3.1. La mesure de la pression de surface	62
2.3.4. Le potentiel de surface	64
2.3.4.1. La mesure du potentiel de surface	67
2.3.5. La radioactivité de surface	68
2.3.6. L'ellipsométrie de surface	70
2.3.7. Incorporation des protéines dans les couches monomoléculaires	70
2.3.8. Mesure des spectres d'absorption et de fluorescence	73
2.4. La mesure de radioactivité de surface	74
2.4.1. Généralités relatives à la technique	75

2.4.2. Effet de la tension sur la sensibilité	76
2.4.3. Effet de la distance sur la sensibilité	77
2.4.3.1. Mise au point d'un système de positionnement micrométrique	79
2.4.4. Effet du débit de gaz sur la sensibilité	80
2.4.5. Influence de la fenêtre sur la sensibilité	80
2.4.6. Conditions optimales d'opération du compteur à radioactivité	82
3. Les films monomoléculaires de cytochrome c	83
3.1. L'isotherme de pression de surface-aire moléculaire du cytochrome c	86
3.2. Influence de la méthode de déposition sur les isother- mes de pression de surface des films de cytochrome c	89
3.3. Influence de la méthode de déposition sur les isother- mes de potentiel de surface et d'ellipsométrie des films de cytochrome c	91
3.4. Vérification des pressions limites d'adsorption et de désorption du cytochrome c	100
3.5. Etablissement de l'isotherme pression de surface-aire moléculaire par la mesure de radioactivité de surface	106
3.6. Modèle de l'organisation moléculaire d'un film de cyto- chrome c soumis à une compression	107
4. Le système binaire dioléoylphosphatidylcholine-cytochrome c	112
4.1. Les propriétés interfaciales de la dioléoylphosphatidyl- choline	112

4.2. Les propriétés interfaciales du système mixte PC(18:1)-cytochrome c	115
4.2.1. Le simple cycle expansion-compression	115
4.2.2. Les cycles expansion-compression multiples opérés depuis forte pression de surface	118
4.2.2.1. La miscibilité du cytochrome c dans les couches monomoléculaires de PC(18:1)	133
4.2.2.2. Confrontation des concentrations interfaciales de protéine estimées par différence des isothermes Π - σ et par radioactivité de surface	140
4.2.3. Les cycles compression-expansion multiples opérés depuis faible pression de surface	145
4.3. Conclusion	154
5. Le système binaire chlorophylle <u>a</u> -cytochrome c	161
5.1. Les propriétés interfaciales de la chlorophylle <u>a</u>	161
5.2. Le système mixte chlorophylle <u>a</u> -cytochrome c	165
5.2.1 Le simple cycle expansion-compression	165
5.2.2. Les cycles expansion-compression multiples	166
5.2.3. Le système chl a-cyt c: un exemple de forte interaction pigment-protéine	173
5.3. Propriétés optiques du mélange chlorophylle <u>a</u> -cytochrome c	176
5.4. La spécificité de l'interaction chlorophylle <u>a</u> -cytochrome c: le rôle du magnésium	181

5.5. Les modèles d'organisation de la chlorophylle dans les thylakoïdes	185
6. Quelques exemples de systèmes lipide-protéine et chlorophylle-protéine présentant une incidence biologique	191
6.1. Le système PC bovine-cytochrome c	191
6.1.1. Les isothermes de pression et de potentiel de surface du mélange PC bovine-cytochrome c	192
6.1.2. Influence de la force ionique de la sous-phase sur l'incorporation du cytochrome c dans une monocouche de PC bovine	197
6.1.3. Concernant l'activité de surface du cytochrome c	204
6.1.4. Conclusion relative aux systèmes PC-cytochrome c	208
6.2. Divers systèmes chlorophylle <u>a</u> -protéine	209
6.2.1. Le mélange chlorophylle <u>a</u> -stellacyanine	209
6.2.2. Le mélange chlorophylle <u>a</u> -plastocyanine	211
6.2.3. Le mélange chlorophylle <u>a</u> -cytochrome f	215
6.2.4. Propriétés d'absorption des films de chlorophylle <u>a</u> et des mélanges lipide-protéine	216
6.2.5. Les facteurs pouvant moduler l'interaction chlorophylle-protéine	219
6.2.5.1. La structure primaire des quatre protéines utilisées	220
6.2.5.2. Les structures secondaires et tertiaires des protéines utilisées	223
7. Conclusion	226

BIBLIOGRAPHIE	233
ANNEXES	
A. Les propriétés interfaciales de l'acide octadécanoïque	254
A.1. L'isotherme de pression de surface-aire moléculaire de l'acide octadécanoïque	254
A.2. Les isothermes de radioactivité de surface-aire moléculaire de l'acide octadécanoïque	259
A.2.1. Influence de la surface de détection sur les isothermes de radioactivité de surface des films d'acide octadécanoïque	260
A.3. L'isotherme de déphasage ellipsométrique-aire moléculaire de l'acide octadécanoïque	269
A.3.1. Correspondance entre les isothermes de pression et d'ellipsométrie de surface	270
A.3.2. Comparaison avec les valeurs de la littérature	272
A.3.3. Simulation de l'isotherme ellipsométrique de l'acide octadécanoïque	273
A.3.3.1. Modèles corrélant l'orientation et l'aire moléculaire	275
A.4. Conclusion	287
B. Particularités d'utilisation de la loi d'additivité dans le calcul des moments dipolaires des systèmes lipide-protéine	295
C. Structures primaires du cytochromes c , de la stellacyanine, de la plastocyanine et du cytochrome f	305

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1. Composition en poids des diverses membranes cellulaires_____	2
2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse de la composition en chaînes grasses de la phosphatidylcholine extraite de la cervelle de boeuf_____	49
3. Récapitulation des conditions optimales d'opération du détecteur de radioactivité de surface pour la dioléoylphosphatidylcholine (PC, 18:1) et le système binaire PC(18:1)-cytochrome c et chlorophylle <u>a</u> -cytochrome c_____	82
4. Comparaison des isothermes de pression de surface en fonction de l'aire moléculaire pour la dioléoylphosphatidylcholine_____	114
5. Comparaison des aires moléculaires de la chlorophylle <u>a</u> dans divers états de compression_____	164
6. Effet de la force ionique de la sous-phase sur l'énergie de stabilisation du cytochrome c dans une monocouche de PC bovine_____	200
7. Comparaison des propriétés d'absorption de la chlorophylle <u>a</u> et des mélanges chlorophylle <u>a</u> -protéine déposés sur des lames de quartz par la méthode de Langmuir-Blodgett à une pression de surface de 20 mN m ⁻¹ _____	217

8. Composition en acides aminés du cytochrome f, de la plastocyanine,
du cytochrome c et de la stellacyanine_____221
9. Comparaison entre les indices d'hydrophobicité du cytochrome f, de
la plastocyanine, du cytochrome c et de la stellacyanine_____224
10. Comparaison entre les aires moléculaires mesurées à diverses
pressions de surface du [1-¹⁴C] acide octadécanoïque étalé à l'interface
air-eau _____256
11. Compilation des couples (n_x , n_z) compris entre (1,4;1,4) et (1,7;1,7)
qui donnent un déphasage ellipsométrique compris entre -1,29 et -
1,31° pour des longueurs de chaîne de 21 et 23 Å_____276
12. Résultats obtenus pour la simulation de l'isotherme
ellipsométrique
de l'acide octadécanoïque en considérant une longueur de chaîne de
23 Å_____280
13. Résumé des solutions présentées aux Figures 83 et 84 qui
permettent une simulation raisonnable de l'isotherme expérimentale
du déphasage ellipsométrique en fonction de l'aire_____286

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1. Modèle de la membrane biologique proposé par Gorter et Grendel en 1925_____	3
2. Modèle de la membrane biologique proposé par Davson et Danielli en 1935_____	4
3. Modèle de la membrane biologique proposé par Singer et Nicolson en 1972_____	6
4. Relation existant entre l'activité de surface et le moment hydrophobe des protéines_____	10
5. Illustration des relations linéaires existant entre l'accroissement de la pression de surface et l'état initial de compression du phospholipide _____	15
6. Isothermes de pression de surface en fonction de l'aire moléculaire de l'albumine du sérum humain, la dipalmitoylphosphatidylcholine et leur mélange de diverses compositions_____	20
7. Vérification de la pureté du NaCl par mesure de la tension superficielle en fonction de la concentration de NaCl_____	52

8. Représentation schématique du montage et des étapes de la purification du NaCl par précipitation au HCl(g)	53
9. Représentation schématique du bassin de Langmuir servant à mesurer les isothermes de pression de surface, de potentiel de surface et de radioactivité de surface en fonction de l'aire moléculaire	59
10. Représentation schématique de la balance de Langmuir servant à mesurer la pression de surface	63
11. Représentation schématique de l'équivalence entre une série de dipôles à l'interface air-eau et un condensateur plan	66
12. Représentation schématique de la procédure expérimentale utilisée afin de préparer les films mixtes lipide-protéine	72
13. Représentation synoptique du montage utilisé afin de mesurer la radioactivité de surface	75
14. Plateau de comptage établi pour des conditions constantes de distance et de débit de gaz	76
15. Effet de la distance source-détecteur sur le compte de radioactivité	78
16. Représentation synoptique du système micrométrique de positionnement du détecteur à la surface du bassin	80
17. Effet du débit de gaz sur la sensibilité du détecteur de radioactivité	81

18. Représentation schématique de la distribution des résidus polaires et hydrophobes d'une protéine dans sa configuration native et étalée à l'interface air-eau_____85
19. Isotherme de pression de surface en fonction de l'aire moléculaire du cytochrome c étalé à l'interface air-eau par déposition de cristaux__87
20. Comparaison des isothermes de pression de surface en fonction de l'aire moléculaire du cytochrome c étalé par diverses méthodes_____90
21. Comparaison des isothermes de potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire du cytochrome c étalé par diverses méthodes_____92
22. Isothermes de pression de surface et de moment dipolaire perpendiculaire en fonction de l'aire moléculaire du cytochrome c étalé à partir d'une solution éthanol:eau (2:1, v:v)_____93
23. Comparaison des isothermes de déphasage ellipsométrique en fonction de l'aire moléculaire du cytochrome c étalé par diverses méthodes_____95
24. Représentation de la relation existant entre la concentration interfaciale, exprimée comme l'inverse de l'aire moléculaire, et le déphasage ellipsométrique mesuré pour un film de cytochrome c organisé à l'interface air-eau_____96
25. Illustration de la dépendance du déphasage ellipsométrique sur l'épaisseur et l'indice de réfraction d'un film mince isotrope_____99

26. Effet des cycles compression-expansion multiples sur les isothermes de pression de surface et de potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire d'un film de cytochrome c _____ 102
27. Effet des cycles compression-expansion multiples sur les isothermes de pression de surface et de potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire d'un film de cytochrome c _____ 103
28. Effet des cycles compression-expansion multiples sur les isothermes de pression de surface et de potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire d'un film de cytochrome c _____ 104
29. Comparaison des isothermes de pression de surface en fonction de l'aire moléculaire obtenues par compression simple et par compressions multiples _____ 105
30. Comparaison des isothermes de pression de surface en fonction de l'aire moléculaire du cytochrome c obtenues par densimétrie et par mesure de la radioactivité de surface _____ 107
31. Représentation schématique du comportement d'un film de cytochrome-c comprimé à diverses pressions de surface _____ 110
32. Isothermes de pression de surface, de potentiel de surface et de déphasage ellipsométrique en fonction de l'aire moléculaire de la dioléoylphosphatidylcholine (PC,18:1) _____ 113

33. Isothermes de pression de surface, de potentiel de surface et de déphasage ellipsométrique en fonction de l'aire moléculaire de la PC(18:1) et du mélange PC(18:1)-cytochrome c _____ 116
34. Isothermes de pression de surface en fonction de l'aire moléculaire de la PC(18:1) et du mélange PC(18:1)-cytochrome c pour des compressions multiples opérées depuis une pression de surface de référence de 30 mN m^{-1} _____ 120
35. Isothermes de potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire de la PC(18:1) et du mélange PC(18:1)-cytochrome c pour des compressions multiples opérées depuis une pression de surface de référence de 30 mN m^{-1} _____ 122
36. Isothermes du moment dipolaire perpendiculaire en fonction de l'aire moléculaire de la PC(18:1) et du mélange PC(18:1)-cytochrome c pour des compressions multiples opérées depuis une pression de surface de référence de 30 mN m^{-1} _____ 123
37. Relation entre le moment dipolaire perpendiculaire et la pression de surface pour la PC(18:1) et pour le système mixte PC(18:1)-cytochrome c soumis à six cycles expansion-compression _____ 126
38. Relation entre le nombre d'équivalents-résidus par lipide et la pression de surface pour le système mixte PC(18:1)-cytochrome c soumis à six cycles expansion-compression _____ 128

39. Relation entre la fraction molaire de protéine et la pression de surface pour le mélange PC(18:1)-cytochrome c soumis à six cycles expansion-compression_____130
40. Comparaison de l'isotherme de moment dipolaire perpendiculaire en fonction de la pression de surface du cytochrome c adsorbé à l'interface air-eau et celui incorporé dans une monocouche de PC(18:1)_____135
41. Représentation schématique des diverses phases d'incorporation d'une protéine dans une monocouche lipidique et de la correspondance du travail requis_____137
42. Relation existant entre l'énergie de stabilisation du cytochrome c incorporé dans une monocouche de PC(18:1) et le nombre d'équivalents-résidus associés par lipide_____140
43. Isothermes de pression de surface et de concentration interfaciale du [^{14}C] cytochrome c en fonction de l'aire moléculaire de la PC(18:1) du mélange PC(18:1)-[^{14}C] cytochrome c soumis à six cycles expansion-compression opérés depuis une pression de surface de référence de 30 mN m^{-1} _____142
44. Comparaison entre le nombre de résidus de protéine associés par lipide déterminé par les mesures de radioactivité et celui déterminé en comparant les isothermes de pression de surface en fonction de l'aire moléculaire pour le lipide et pour le mélange lipide-protéine____145

45. Isothermes de pression de surface en fonction de l'aire moléculaire de la PC(18:1) et pour le mélange PC(18:1)-cytochrome c soumis à dix cycles compression-expansion opérés depuis faibles pressions de surface_____147
46. Isothermes de la fraction molaire résiduelle de la protéine en fonction de la pression de surface obtenues pour les dix cycles compression-expansion présentés à la Figure 45_____150
47. Comparaison entre les moments dipolaires perpendiculaires mesurés et calculés pour le mélange PC(18:1)-cytochrome c soumis à des cycles compression-expansion opérés depuis faible pression de surface_____152
48. Représentation schématique des deux composantes contribuant au moment dipolaire total du système binaire PC(18:1)-cytochrome c soumis à divers états de compression_____158
49. Isothermes de pression de surface et de potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire obtenues pour la chlorophylle a_____162
50. Représentation de la structure chimique de la chlorophylle a_____162
51. Représentation schématique de l'orientation possible de la chlorophylle a à l'interface air-eau_____163
52. Isothermes de pression de surface et de potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire obtenues pour la chlorophylle a et pour le mélange chlorophylle a-cytochrome c_____166

53. Isothermes de pression de surface et de concentration interfaciale en fonction de l'aire moléculaire obtenues pour la chlorophylle a et pour le système binaire chlorophylle a-cytochrome c soumis à deux cycles expansion-compression_____167
54. Relation entre le nombre d'équivalents-résidus associés par molécule de chlorophylle a et l'état de compression de la monocouche_168
55. Relation entre la fraction molaire résiduelle de protéine et l'état de compression de la monocouche du système mixte chlorophylle a-cytochrome c_____169
56. Comparaison des isothermes mesurées et calculées du moment dipolaire perpendiculaire en fonction de la pression de surface pour le système mixte chlorophylle a-cytochrome c_____174
57. Différences entre les moments dipolaires perpendiculaires mesurés et calculés pour le mélange chlorophylle a-cytochrome c____175
58. Spectre d'absorption de la chlorophylle a et du mélange chlorophylle a-cytochrome c en films Langmuir-Blodgett sur une lame de quartz hydrophile déposée à une pression de surface de 20 mN m⁻¹_____178
59. Spectre d'émission de la chlorophylle a et du mélange chlorophylle a-cytochrome c en films Langmuir-Blodgett sur une lame de quartz hydrophile déposée à une pression de surface de 20 mN m⁻¹_____180

60. Isothermes de pression de surface et de potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire obtenues pour la phéophytine a et pour le mélange phéophytine a-cytochrome c _____ 183
61. Comparaison des isothermes mesurées et calculées de moment dipolaire perpendiculaire en fonction de la pression de surface pour le système phéophytine a-cytochrome c _____ 184
62. Isothermes de pression de surface et de potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire obtenues pour la phosphatidylcholine (PC) bovine et le mélange PC bovine-cytochrome c _____ 193
63. Isothermes de pression de surface et de potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire obtenues pour la PC bovine et le mélange PC bovine-cytochrome c en présence de 0,1 M de NaCl dans la sous-phase _____ 198
64. Isothermes de pression de surface et de potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire obtenues pour la PC bovine et le mélange PC bovine-cytochrome c en présence de 0,3 M de NaCl dans la sous-phase _____ 198
65. Isothermes de pression de surface et de potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire obtenues pour la PC bovine et le mélange PC bovine-cytochrome c en présence de 0,5 M de NaCl dans la sous-phase _____ 199

66. Isothermes de pression de surface et de potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire obtenues pour la PC bovine et le mélange PC bovine-cytochrome c en présence de 1,0 M de NaCl dans la sous-phase_____199
67. Représentation vectorielle du moment hydrophobe des trois hélices- α du cytochrome c_____207
68. Isothermes de pression de surface et de potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire obtenues pour la chlorophylle a et le mélange chlorophylle a-stellacyanine en présence de 0 et 0,5 M de NaCl dans la sous-phase_____210
69. Isothermes de pression de surface et de potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire obtenues pour la chlorophylle a et le mélange chlorophylle a-plastocyanine en présence de 0 et 0,5 M de NaCl dans la sous-phase_____212
70. Isothermes de pression de surface et de potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire obtenues pour la chlorophylle a et le mélange chlorophylle a-cytochrome f_____215
71. Isothermes de pression de surface et de radioactivité de surface en fonction de l'aire moléculaire du [1- ^{14}C] acide octadécanoïque étalé à l'interface air-eau (Surface de fenêtre de 25,5 cm²)_____255

72. Ecart maximum relatif à la mesure de radioactivité de surface d'une monocouche de $[1-^{14}\text{C}]$ acide octadécanoïque soumise à un cycle compression-expansion-compression (Surface de fenêtre de $25,5 \text{ cm}^2$) _____ 261
73. Isothermes de pression de surface et de radioactivité de surface en fonction de l'aire moléculaire du $[1-^{14}\text{C}]$ acide octadécanoïque étalé à l'interface air-eau (Surface de fenêtre de $1,0 \text{ cm}^2$) _____ 262
74. Ecart maximum relatif à la mesure de radioactivité de surface d'une monocouche de $[1-^{14}\text{C}]$ acide octadécanoïque soumise à un cycle compression-expansion-compression (Surface de fenêtre de $1,0 \text{ cm}^2$) _____ 262
75. Représentation de l'écart maximal relatif du signal de radioactivité de surface en fonction de l'aire moléculaire d'un film de $[1-^{14}\text{C}]$ acide octadécanoïque pour diverses surfaces de fenêtres _____ 263
76. Relations entre l'inverse du compte de radioactivité et l'aire moléculaire d'une monocouche d'acide octadécanoïque mesurées pour diverses surfaces actives de fenêtres _____ 267
77. Relation entre le paramètre de sensibilité (K') et la surface active de la fenêtre du détecteur _____ 268
78. Comparaison entre les aires moléculaires mesurées par radioactivité de surface et les aires moléculaires moyennes estimées de l'acide octadécanoïque pour un étalement homogène à l'interface air-eau _____ 268

79. Isothermes de pression de surface et de déphasage ellipsométrique en fonction de l'aire moléculaire obtenues pour l'acide octadécanoïque étalé à l'interface air-eau_____	271
80. Représentation schématique du modèle du cône_____	278
81. Représentation schématique du redressement d'une molécule d'acide gras à l'interface air-eau_____	282
82. Isothermes simulées du déphasage ellipsométrique en fonction de l'aire moléculaire en considérant le modèle du parallélépipède_____	283
83. Comparaison des solutions de l'isotherme ellipsométrique en fonction de l'aire moléculaire obtenues par simulation à l'aide du modèle du parallélépipède et l'isotherme expérimentale (Longueur de chaîne, 21 Å)_____	284
84. Comparaison des solutions de l'isotherme ellipsométrique en fonction de l'aire moléculaire obtenues par simulation à l'aide du modèle du parallélépipède et l'isotherme expérimentale (Longueur de chaîne, 23 Å)_____	285
85. Représentation schématique de l'empaquetage des sections transversales des chaînes d'acides gras tel que considéré dans les modèles du solide rectangulaire et de l'hexagone_____	288
86. Comparaison des isothermes simulées selon les modèles du parallélépipède, du modèle de l'hexagone et des valeurs expérimentales_____	288

87. Isothermes mesurées et calculées du moment dipolaire perpendiculaire et de la fraction molaire résiduelle de protéine en fonction de la pression de surface pour le système PC(18:1)-cytochrome c soumis à six cycles expansion-compression opérés depuis une pression de surface de référence de 30 mN m^{-1} en considérant une pression limite de 4 mN m^{-1} _____ 298

88. Isothermes mesurées et calculées du moment dipolaire perpendiculaire et de la fraction molaire résiduelle de protéine en fonction de la pression de surface pour le système PC(18:1)-cytochrome c soumis à six cycles expansion-compression opérés depuis une pression de surface de référence de 30 mN m^{-1} en considérant une pression limite de 8 mN m^{-1} _____ 299

89. Isothermes mesurées et calculées du moment dipolaire perpendiculaire et de la fraction molaire résiduelle de protéine en fonction de la pression de surface pour le système PC(18:1)-cytochrome c soumis à six cycles expansion-compression opérés depuis une pression de surface de référence de 30 mN m^{-1} en considérant une pression limite de 12 mN m^{-1} _____ 300

90. Isothermes mesurées et calculées du moment dipolaire perpendiculaire et de la fraction molaire résiduelle de protéine en fonction de la pression de surface pour le système PC(18:1)-cytochrome c soumis à six cycles expansion-compression opérés depuis une pression de surface de référence de 30 mN m^{-1} en considérant une pression limite de 16 mN m^{-1} _____ 301

91. Isotherme du nombre d'équivalents-résidus par lipide en fonction de la pression de surface limite considérée pour le sixième cycle compression-expansion présenté à la Figure 34 pour le mélange PC(18:1)-cytochrome c_____302

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Les fonctions associées aux membranes biologiques sont essentielles au maintien de la vie. La multiplicité de ces fonctions, qui bien souvent peuvent être inverses, requiert un cloisonnement de celles-ci. Par exemple, les acides gras qui sont utilisés dans la biosynthèse des membranes et comme source d'emmagasiner d'énergie, sont synthétisés dans le cytosol alors qu'ils sont dégradés dans les mitochondries (Alberts (1983)). Cette compartimentation est nécessaire afin d'éviter les effets antagonistes des nombreuses fonctions cellulaires et de permettre la création des gradients chimiques et ioniques nécessaires à la conversion énergétique. Les membranes biologiques ne sont pas de simples barrières à diffusion mais elles sont également impliquées dans une multitude de mécanismes de pompage ionique, de régulation des transports ioniques et moléculaires, de récepteurs chimiques, ioniques, électromagnétiques et de conversion énergétique.

La problématique de la structure et de la fonction des diverses membranes biologiques fait appel à de nombreuses disciplines, de la biologie cellulaire à la physique quantique. Quoique les approches dont ces sciences s'inspirent soient différentes, le but visé est le même, à savoir la compréhension de la structure et de la fonction des membranes biologiques, ainsi que de la relation existant entre ces deux aspects. Afin de comprendre

l'organisation des systèmes biologiques, il faut avant tout identifier les constituants majeurs des biomembranes.

Tableau 1
Composition en poids de diverses membranes cellulaires. Tiré de
Robertson(1983).

Membranes	Lipides (%)	Protéines (%)
Myéline	80	20
Chloroplaste	50	50
Erythrocyte	40	60
Microsome	32	68
Mitochondrie	26	74

Les membranes biologiques sont constituées presque exclusivement de lipides et de protéines. La proportion des constituants est aussi diverse qu'il existe de membranes différentes. Cette variabilité est illustrée au Tableau 1 où est donnée la composition en poids de protéines et de lipides de diverses membranes cellulaires. L'organisation des deux constituants majeurs des membranes biologiques a donné lieu à de nombreux modèles de la membrane cellulaire. Attardons-nous aux trois modèles majeurs: le modèle de Gorter et Grendel, le modèle de Davson-Danielli et celui de Singer et Nicholson.

1.1 Les modèles de membranes biologiques

1.1.1 Le modèle de Gorter et Grendel. La vision que l'on avait des membranes biologiques dans les années 1920 était très vague. La nature même des constituants restait à définir. Ainsi, en supposant que les lipides sont les constituants de la membrane biologique, Gorter et Grendel (1925) ont

montré que le matériel recueilli par extraction à l'acétone des chromocytes (erythrocytes) du sang occupe à l'interface air-eau le double de la surface présentée par les chromocytes dont ils proviennent. Cette constatation a amené les auteurs à proposer que la membrane biologique est constituée d'un double feuillet lipidique. Cette configuration est illustrée à la Figure 1.

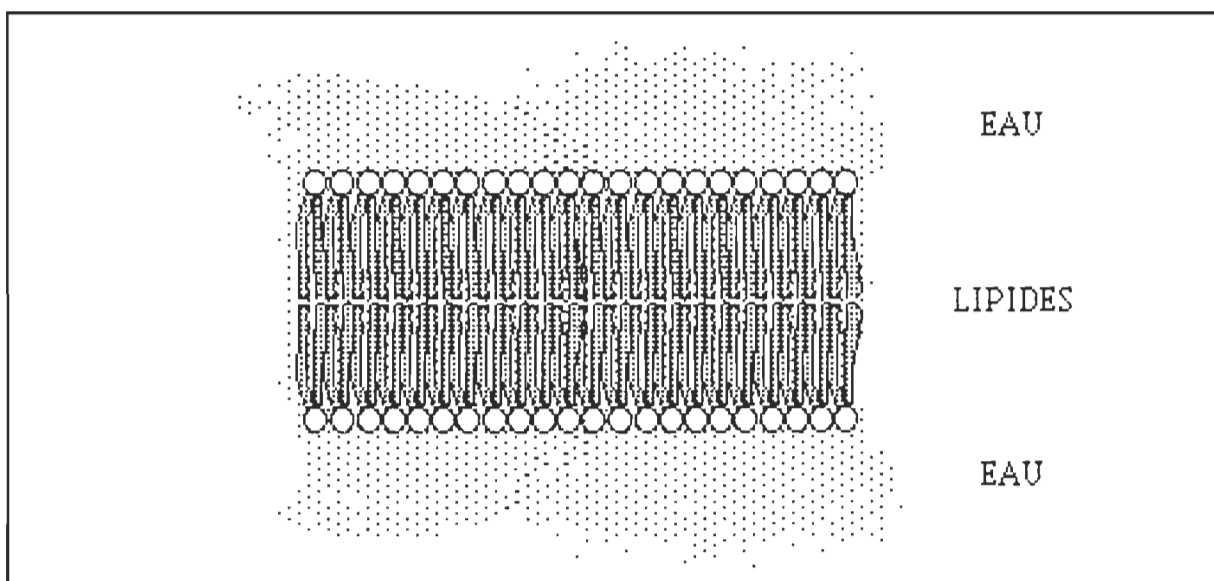


Figure 1. Modèle de la structure de la membrane biologique proposé par Gorter et Grendel en 1925. Ce modèle prévoit que la membrane biologique est simplement composée d'une bicouche lipidique séparant deux phases aqueuses.

Ce modèle, qui a donné naissance à l'organisation des lipides telle que nous la connaissons aujourd'hui, est entaché de deux erreurs. Premièrement, les auteurs ont supposé que les lipides sont les seuls constituants de la membrane des chromocytes or, comme il est montré au Tableau 1, cette membrane contient une fraction appréciable de protéines. Comme ces protéines ne furent pas extraites, les auteurs ont surestimé l'aire occupée par les lipides au sein de la membrane des chromocytes. Cependant, cette erreur

fut compensée par une compression incomplète de la monocouche et une extraction partielle des lipides.

1.1.2 Le modèle de Danielli-Davson. L'observation que la tension de surface de la membrane cellulaire est trop faible pour correspondre à celle de la surface lipidique amena Danielli et Davson à considérer qu'une couche de protéine est accolée à la bicouche lipidique. Les protéines jouant le rôle d'un surfactant, la tension de surface de la couche lipidique est moindre. De plus, ce modèle attribue un rôle stabilisateur aux protéines agissant sur les lipides. Il est intéressant de constater que dans les modèles modernes, c'est plutôt aux lipides que l'on assigne un rôle de stabilisation des protéines. Deux versions du modèle de Davson et Danielli sont présentées à la Figure 2.

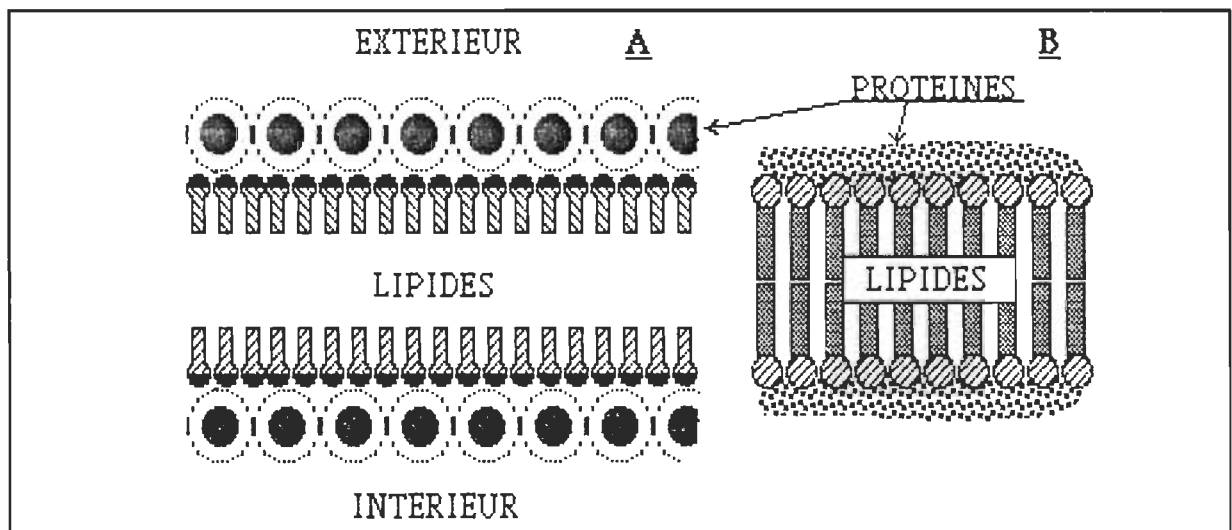


Figure 2. Modèle de la membrane biologique proposé par Danielli et Davson en 1935. A) dans ce modèle, une couche de protéine globulaire est adsorbée à la surface de la couche lipidique. B) Une variation, connue comme le modèle de Danielli-Davson-Robertson, prévoit que suite à l'adsorption, la conformation de la protéine est grandement modifiée, donnant lieu à une couche de protéine "dénaturée".

Le modèle de Danielli-Davson prévoit que la surface de la bicouche lipidique est couverte par une couche de protéine globulaire adsorbée depuis la phase aqueuse. Une variation de ce modèle connue comme le modèle de Danielli-Davson-Robertson suppose que suite à l'adsorption, la protéine subit des changements structuraux importants donnant lieu à une couche protéique "dénaturée". Le terme "dénaturation" fait appel aux changements conformationnels importants que subissent les protéines suite à leur adsorption à l'interface lipide-eau. L'utilisation de ce terme n'implique rien au niveau de l'intégrité fonctionnelle de la protéine, ni de la réversibilité de ce processus.

Quoique ces modèles prévoient l'organisation des deux principaux constituants membranaires, ils présentent certaines faiblesses. La proportion de protéine retrouvée dans les membranes biologiques est si grande qu'en supposant l'organisation suggérée par le modèle de Danielli-Davson, la protéine doit couvrir la totalité de la surface lipidique, restreignant grandement le contact entre la phase aqueuse et la surface de la bicouche. Cependant, certaines protéines solubles ont une action enzymatique à la surface de la phase lipidique; c'est notamment le cas des phospholipases qui "in vivo" sont responsables de l'hydrolyse des chaînes grasses des phospholipides. Il est difficile de concilier l'action des phospholipases avec la présence d'une éventuelle couche protéique isolant la phase lipidique du milieu aqueux.

1.1.3 Le modèle de Singer et Nicolson. Le modèle de Singer et Nicolson (1972) se démarque de la bicouche lipidique de Gorter et Grendel et des

protéines de surface de Danielli et Davson en permettant aux protéines d'être intégralement incluses dans la bicouche. Cet agencement des protéines membranaires permet plus aisément de concevoir la relation structure-fonction des protéines impliquées dans les mécanismes de transport et de reconnaissance membranaire. Une représentation de ce modèle est donnée à la Figure 3.

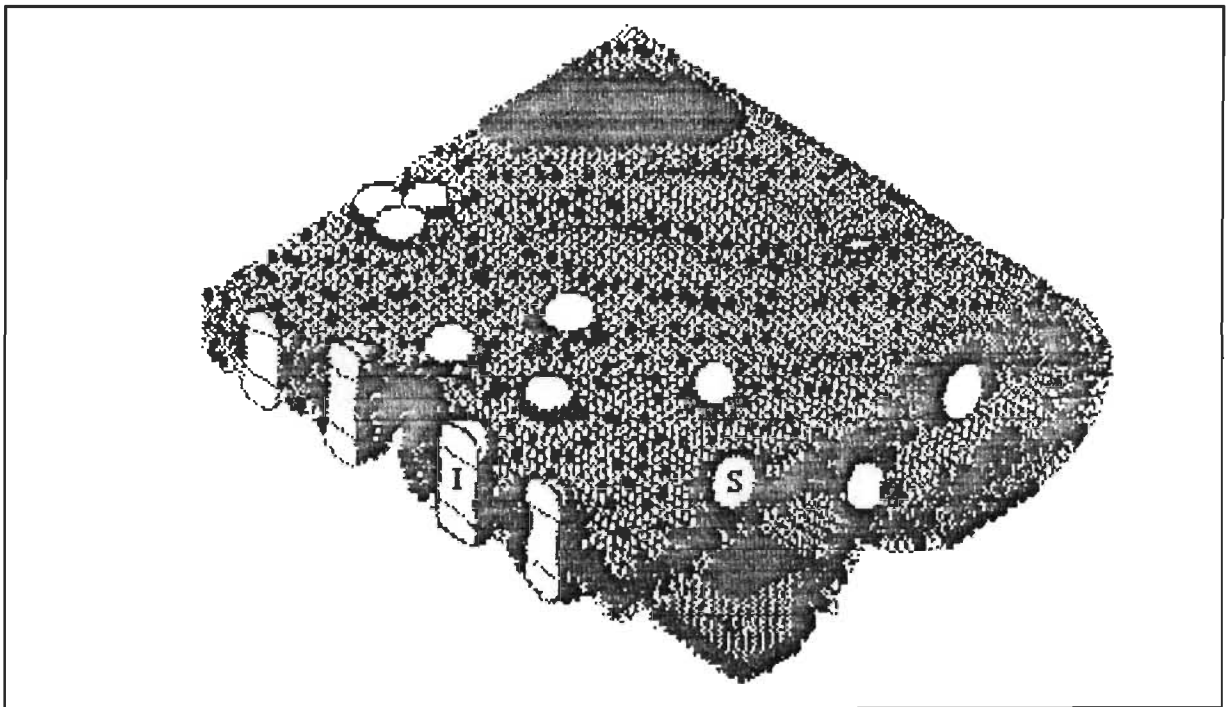


Figure 3. Modèle de la mosaïque fluide proposé par Singer et Nicolson (1972) afin d'expliquer la structure des membranes biologiques. Ce modèle se distingue de celui de Danielli-Davson puisqu'il permet aux protéines d'être incorporées à la surface (S) ou intégralement (I) aux membranes. Ce modèle permet notamment de comprendre de nombreuses fonctions membranaires attribuées aux protéines. Tiré de Israelachvili (1978).

Singer et Nicolson reconnaissent deux classes de protéines associées aux membranes biologiques: les protéines intégrales (ou protéines de membrane)

et les protéines périphériques (ou protéines de surface). Les critères utilisés par ces auteurs afin de faire la distinction entre ces deux classes de protéines sont intéressants. Les protéines périphériques sont caractérisées par le fait qu'elles peuvent être extraites par des traitements doux tels l'augmentation de la force ionique de la phase aqueuse ou l'addition d'agents chélatants. Ces protéines se dissocient de la membrane sans demeurer associées aux lipides. Les formes dissociées sont relativement solubles dans les solutions tamponnées neutres. Ces critères suggèrent que les protéines périphériques sont associées aux membranes par de faibles interactions non-covalentes. Le cytochrome c de la membrane mitochondriale et la spectrine de la membrane des erythrocytes sont des protéines périphériques. L'extraction des protéines intégrales requiert l'emploi de détergents, de dénaturants protéiques ou de solvants organiques. Maintes fois, ces protéines sont extraites sous forme de lipoprotéines, c'est-à-dire associées à des lipides. Généralement, les formes délipidées sont insolubles ou agrégées dans les solutions tamponnées neutres. A ce point, nous pouvons mettre en évidence que les interactions lipide-protéine sont faibles dans le cas des protéines périphériques alors qu'elles sont fortes dans le cas des protéines intégrales. Le modèle de Singer et Nicolson est encore le modèle le plus couramment utilisé afin d'expliquer la structure des membranes biologiques.

Ce modèle présente certaines contraintes thermodynamiques en ce qui concerne la structure adoptée par les protéines de membranes. Voyons rapidement certaines de ces contraintes.

1.2 Éléments relatifs à la structure des protéines

Afin de mieux comprendre les forces mises en cause lors de la stabilisation des protéines intégrales, nous devons d'abord comprendre les forces régissant la structure des protéines hydrosolubles. Voyons rapidement ces facteurs.

1.2.1 Les protéines hydrosolubles. Les structures adoptées par les protéines solubles sont multiples. La rationalisation des principes gouvernant la structure adoptée par une protéine présente un défi de taille. Par analyse des niveaux de structure primaire, secondaire et tertiaire d'un certain nombre de protéines solubles, un patron général des principes gouvernant l'organisation des résidus au sein de la structure tridimensionnelle des protéines hydrosolubles a été observé (Chothia (1974); Richards, F.M. (1977); Janin (1979); Rose et coll. (1985) et Guy (1985)). Généralement, les résidus hydrophobes ont tendance à se grouper au cœur de la structure alors que les résidus polaires sont libres d'interagir avec la phase aqueuse. L'eau est ainsi exclue du centre "huileux" de la protéine où les interactions hydrophobes sont dominantes. Dans l'enveloppe polaire, les ponts hydrogène peuvent librement prendre place entre les résidus polaires et l'eau. Cette organisation est nommée "modèle de la goutte d'huile".

1.2.2 Les protéines intégrales de membrane. Le milieu membranaire présente des contraintes thermodynamiques importantes à l'insertion des

protéines dans le cœur hydrocarboné de la bicouche. Les chaînes aliphatiques des lipides composant la bicouche ne peuvent participer à l'établissement des ponts hydrogène avec la surface transmembranaire de la protéine; ce rôle est joué par l'eau pour les protéines globulaires. Cependant, les nombreux groupements amines et carbonyles présents sur le squelette polypeptidique demandent à être couplés afin que l'énergie du système soit minimale. Le milieu hydrocarboné n'offrant pas cette possibilité de couplage, la structure adoptée par la protéine dans la portion hydrocarbonée devra être autosuffisante dans l'établissement des ponts hydrogène. La structure régulière la plus stable qui s'accommode le mieux de cette contrainte est l'hélice- α (Kennedy (1978)). Cependant, les chaînes latérales des acides aminés organisés sous forme d'hélice- α pointent radialement vers le milieu extérieur hydrophobe. Afin d'être stable, les portions membranaires structurées en hélice- α doivent comporter des chaînes latérales hydrophobes de même nature que le milieu environnant. L'élucidation récente des divers niveaux de structure de plusieurs protéines membranaires a permis de constater que les résidus enfouis dans les membranes sont essentiellement non-polaires (Eisenberg (1984); Eisenberg et coll. (1984a) et Eisenberg et coll. (1984b)).

1.2.3 Les protéines périphériques. Les protéines périphériques présentent par leur attachement à la membrane des propriétés de protéines intégrales et par leur solubilité dans les solutions aqueuses, des propriétés de protéines solubles. Quels sont les facteurs structuraux pouvant permettre à une même molécule de présenter cette dualité tout en étant stable? Bien peu de réponses sont présentement connues.

Un des modèles ayant émergé ces dernières années confère à certains types d'hélices- α une activité de surface (Krebs et Phillips (1983); Krebs et Phillips(1984); Eisenberg (1984); Eisenberg et coll. (1984a) et Eisenberg et coll. (1984b)). Essentiellement, ce modèle veut que l'incorporation des hélices- α à la surface des membranes biologiques soit favorisée pour les hélices présentant une distribution asymétrique des résidus hydrophiles et hydrophobes à leurs surfaces. Afin de quantifier ce concept, ces auteurs suggèrent le calcul de deux valeurs: l'hydrophobicité moyenne des résidus présents au sein de l'hélice- α (l'indice d'hydrophobicité \bar{H}) et une quantité vectorielle traduisant l'asymétrie de distribution des résidus polaires et non-polaires, le moment hydrophobe, μ_H . La distinction faite par les auteurs entre les protéines solubles, périphériques et intégrales est présentée à la Figure 4.

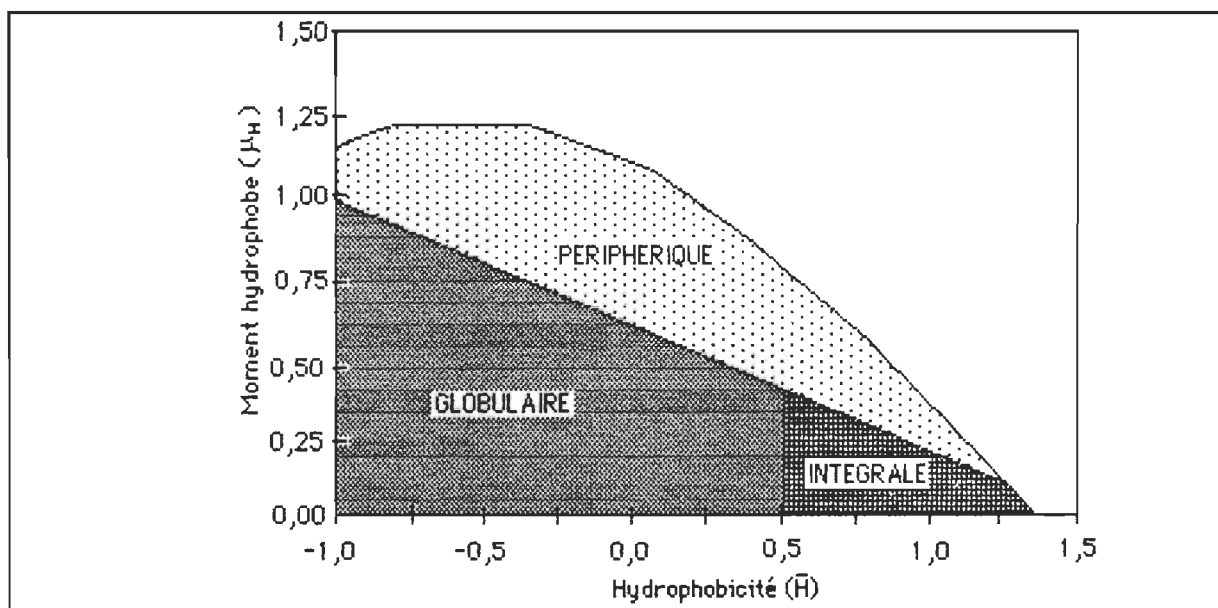


Figure 4. Relation entre l'activité de surface, l'indice d'hydrophobicité (\bar{H}) et le moment hydrophobe (μ_H) des protéines. Cette figure est tirée de Eisenberg et coll. (1984b).

Les protéines intégrales de membrane sont caractérisées par un fort indice d'hydrophobicité et un faible moment hydrophobe. Ces protéines présentent un contenu important de résidus hydrophobes qui comportent une distribution angulaire homogène du caractère hydrophobe sur l'enveloppe extérieure de l'hélice. Les protéines solubles présentent de faibles hydrophobicités et des moments hydrophobes faibles. Cette définition des protéines solubles est en accord avec la présence de résidus polaires à la surface de celles-ci. Les protéines périphériques peuvent présenter de forts ou de faibles indices d'hydrophobicité. Plus l'hydrophobicité de l'hélice- α sera prononcée, moins le moment hydrophobe requis devra être grand afin que l'attachement de la protéine à la membrane se produise.

Ce modèle, qui repose sur des considérations thermodynamiques, est intéressant et corrobore la relation existant entre l'activité de surface, l'indice d'hydrophobicité et le moment hydrophobe de plusieurs protéines solubles, de surface et transmembranaires. Ce modèle, principalement applicable aux structures régulières organisées sous forme d'hélices- α , ne fournit cependant aucune explication de l'activité de surface d'une protéine périphérique comme la plastocyanine qui ne présente aucun segment organisé en hélice- α . (Colman et coll. (1978)). De plus, cette approche ne donne aucune explication des facteurs qui modulent l'attachement ou le détachement de la protéine de la membrane.

1.3 Etude des interactions lipide-protéine à l'aide de la technique des monocouches.

Nous venons de montrer que les interactions entre les deux composants majeurs des membranes biologiques sont diverses. Afin de qualifier et de quantifier ces interactions, il est d'intérêt d'utiliser des systèmes modèles présentant une grande simplicité structurale. L'approche synthétique veut qu'il soit possible, en complexifiant graduellement la composition ou les facteurs agissant sur le système, d'identifier les forces intervenant dans la stabilisation des membranes biologiques. Principalement trois modèles de membrane sont utilisés à cette fin, soit les bicouches opaques (BLM), les liposomes et les monocouches.

Les films bimoléculaires présentent une structure analogue au modèle proposé par Gorter et Grendel. Ces structures résultent de l'auto-association des lipides contraints à s'organiser dans un environnement aqueux. Parce qu'ils permettent un cloisonnement de la phase aqueuse, ces modèles de membrane se prêtent bien à l'étude des phénomènes de transport. Cependant, ces systèmes ne permettent pas de varier la densité, non plus que la pression de surface des lipides. Pour cette raison, il est impossible de se servir des bicouches afin de vérifier l'effet de la pression latérale sur l'incorporation des protéines.

La technique des monocouches est souvent utilisée afin de mimer l'organisation qu'adoptent les lipides au sein des membranes biologiques. Cette

technique permet l'organisation anisotrope des lipides ou autres amphiphiles à l'interface air-eau ou air-huile. Par réduction de la surface accessible pour chaque molécule, il est possible de modifier l'énergie libre de surface du film. L'extension des résultats obtenus par la technique des monocouches à la structure des biomembranes requiert l'approximation que la monocouche présente le comportement d'une demi-bicouche. A cet égard, certains auteurs questionnent le choix de l'interface air-eau afin de mimer le système biologique (Gruen et Wolfe (1982)). Essentiellement, leur raisonnement est le suivant: 1) dans la membrane biologique, les chaînes hydrocarbonées des lipides sont groupées dans un milieu excluant l'eau; 2) la tension de surface de la frontière chaînes hydrocarbonées-chaînes hydrocarbonées doit grossièrement être nulle; 3) la tension de surface d'une interface hydrocarbure-air est non-nulle et vaut environ 20 mN m^{-1} ; 4) afin de présenter des conditions d'interface identiques à celles retrouvées dans une bicouche, une monocouche doit être constituée à l'interface air-milieu hydrocarboné. Cependant, la pénétration de l'huile (dont les molécules sont généralement plus petites que le lipide constituant le film) entre les molécules de lipide peut affecter de façon significative le comportement interfacial du lipide. De plus, dans le cas des systèmes lipide-protéine, certaines mesures comme la radioactivité de surface sont difficilement accessibles à cause de la grande absorptivité de l'huile comparativement à l'air. Pour cette raison, nous avons choisi de travailler à l'interface air-eau.

Différents systèmes lipide-protéine furent étudiés par la technique des monocouches. Parfois, ces études visent à comprendre l'intégrité fonctionnelle

de ces systèmes mais, dans la plupart des cas, ces études visent à caractériser l'influence de certains paramètres énergétiques (essentiellement la pression de surface) sur l'incorporation de protéines dans une monocouche lipidique et de mesurer la force de l'interaction avec le lipide. Avant de présenter un résumé de ces études, attardons-nous aux stratégies utilisées afin d'étudier les interactions lipide-protéine par la technique des monocouches..

1.3.1 Stratégies d'étude des interactions lipide-protéine par la technique de monocouches. Plusieurs stratégies sont utilisées afin de qualifier et de quantifier les interactions entre les films de lipides et les protéines. Les prochaines sections visent à résumer les principales approches utilisées.

1.3.1.1 Les cinétiques d'accroissement de la pression de surface, les cinétiques d'accroissement de l'aire moléculaire. Deux types de cinétiques sont rapportées dans la littérature: 1) l'accroissement de la pression de surface de la monocouche mesuré à aire constante, et 2) l'accroissement de l'aire moléculaire mesuré à pression constante, suite à l'injection de la protéine dans la sous-phase. Comme le mentionne Wilkinson et coll. (1986), les deux mesures permettent de tirer des conclusions identiques concernant l'incorporation de la protéine dans la monocouche. De ces cinétiques, les paramètres importants sont la vitesse initiale d'accroissement de la pression de surface ou de l'aire et le pourcentage d'accroissement de la pression de surface ou de l'aire moléculaire mesuré à l'équilibre. Ces deux paramètres traduisent indirectement la vitesse d'incorporation de la protéine dans la monocouche.

1.3.1.2 Influence de la pression de surface de la monocouche sur l'incorporation de la protéine. La présentation des résultats la plus couramment rencontrée dans la littérature est sans doute celle où est présenté l'effet de l'état initial de compression du lipide (avant l'ajout de la protéine) sur l'accroissement de la pression de surface ($\Delta\Pi$) mesuré à l'équilibre. Des exemples de ces résultats, obtenus pour les systèmes phosphatidylcholine (PC)-cytochrome c (en présence ou non de NaCl dans la sous-phase), acide octadécanoïque-cytochrome c (cyt c), octadécanol-cyt c et octadécylamine-cyt c sont présentés à la Figure 5.

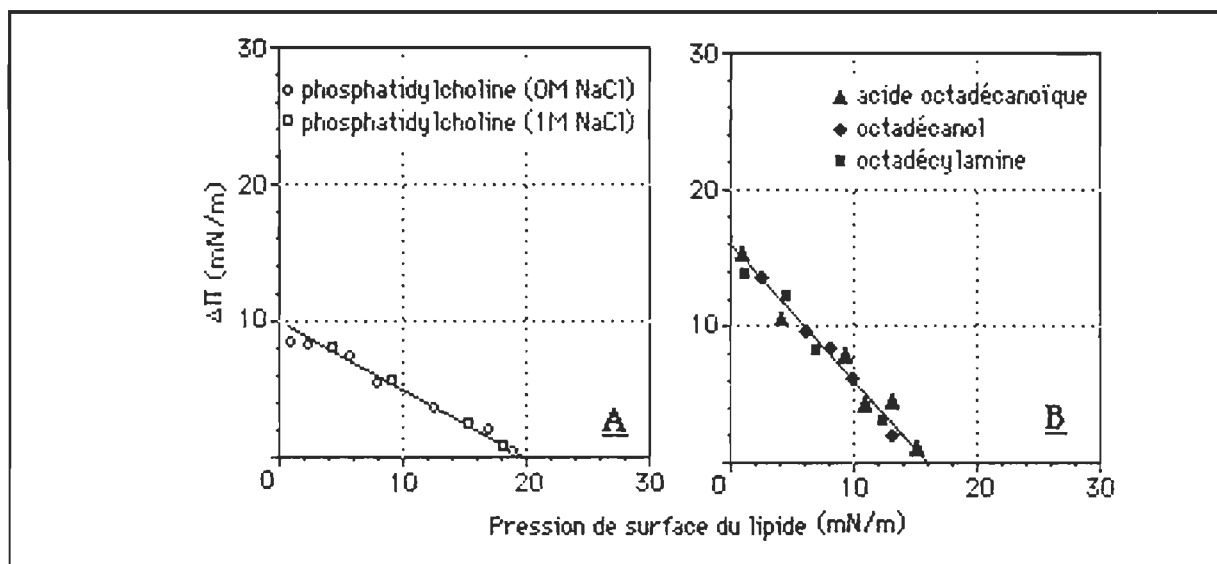


Figure 5. Illustration des relations linéaires existant entre l'accroissement de la pression de surface, $\Delta\Pi$, et l'état initial de compression du phospholipide. Ces résultats furent obtenus pour les systèmes A) phosphatidylcholine-cytochrome c et B) acide octadécanoïque-cytochrome c, octadécanol-cytochrome c et octadécylamine-cytochrome c. La partie A) est tirée de Quinn et Dawson (1969b) et la partie B) de Morse II et Deamer (1973).

Il est possible de constater deux comportements distincts. D'une part, la pression de surface mesurée à l'équilibre est invariable, peu importe l'état initial de compression de la monocouche (Fig. 5B); d'autre part, elle décroît alors que la pression de surface initiale de la monocouche diminue (Fig. 5A). L'accroissement de la pression de surface est une manifestation directe de la pénétration de la protéine dans la monocouche. Pour s'en convaincre, il suffit de constater la coïncidence existant entre la concentration interfaciale de protéine et l'augmentation de la pression de surface (Quinn et Dawson (1969a, 1969b); Demel et coll. (1973)). Toutefois, la prudence s'impose lors de l'interprétation de cet effet pour un système qui présente une forte interaction lipide-protéine de nature électrostatique. Dans ce cas, la cinétique d'augmentation de la pression de surface résulte souvent de deux effets antagonistes: 1) l'accroissement de la pression de surface causée par la pénétration de la protéine et 2) la condensation du film lipidique provoquée par la neutralisation des charges résultant de l'interaction lipide-protéine. La superposition de ces deux effets donne lieu à un comportement biphasique (Bougis et coll. (1981)).

L'extrapolation de la droite pour $\Delta\Pi = 0$ donne une mesure de la capacité de pénétration des protéines dans les monocouches. En référant à la Figure 5, nous pouvons constater que le cytochrome c a une plus grande capacité de pénétration dans les monocouches de phosphatidylcholine que dans les monocouches d'acide octadécanoïque. Ces résultats montrent également que, dans certains cas, la position d'équilibre de l'incorporation est déterminée par la pression finale du film. Dans ce cas, l'incorporation de la protéine se produit

jusqu'à ce que la pression d'équilibre soit atteinte. Pour un tel mécanisme, la valeur de la pression d'équilibre ne dépend ni de la concentration de la protéine, ni de la pression initiale à laquelle le lipide est comprimé. Le second comportement montre que la pression finale atteinte par le système mixte dépend de l'état initial de compression de la monocouche. Ce comportement qui est noté pour la majorité des systèmes lipide-protéine est très peu interprété.

1.3.1.3 Identification des conditions maximisant l'incorporation des protéines dans les monocouches lipidiques. L'étude de l'influence de divers paramètres sur la vitesse d'incorporation et la pression d'équilibre constitue l'essentiel des études rapportant l'utilisation de la technique des monocouches dans l'étude d'un système lipide-protéine. Les paramètres qui sont généralement étudiés sont la nature de la tête polaire et des chaînes hydrocarbonées des lipides, l'effet du pH et l'effet de la concentration ionique de la sous-phase. Nous désirons apporter deux commentaires sur l'effet du pH et de la force ionique.

Dans les études traitant de l'effet du pH de la sous-phase sur l'incorporation des protéines, il apparaît que généralement l'incorporation de la protéine dans la monocouche lipidique est maximal au point isoélectrique (Quinn et Dawson (1969a,b); Pattus et coll. (1983)). Il se trouve que l'activité de surface des protéines à l'interface air-eau est maximale au point isoélectrique du polypeptide. C'est d'ailleurs dans ces conditions que les pertes de matériel des films minces de protéine sont minimales (Neurath et Bull (1938); Trurnit

(1960)). Il est donc important, en statuant sur l'interaction d'une protéine et d'une monocouche lipidique, de distinguer entre l'affinité des deux constituants et l'activité de surface que possède la protéine. Cette seconde manifestation n'est pas le fruit de l'affinité des deux composés.

Il est coutume d'accroître la force ionique de la sous-phase afin de statuer sur la nature électrostatique de l'interaction. Dans le cas de l'interaction de la colicine A (Pattus et coll. (1983)) et du cytochrome c (Quinn et Dawson (1969b)) avec des monocouches chargées négativement, l'ajout de NaCl au contenu de la sous-phase permet d'inhiber l'interaction entre les deux composés. L'ajout d'ions à la sous-phase a deux effets distincts: 1) l'interaction avec la protéine, 2) l'interaction avec le film de lipide. L'inhibition de l'interaction lipide-protéine est généralement une conséquence de ces deux effets. Imaginons le cas où la portion hydrophobe d'une protéine interagit avec la monocouche. L'ajout de sel peut accroître la solubilité de la protéine dans la sous-phase et provoquer son détachement de la monocouche. Dans ce cas, l'effet du sel ne traduit pas le caractère électrostatique de l'interaction lipide-protéine.

1.3.1.4 Mesure des isothermes de pression de surface-aire moléculaire des mélanges lipide-protéine.. Une méthodologie distincte de la mesure des cinétiques d'incorporation consiste à mesurer les isothermes pression de surface(Π)-aire moléculaire(σ) des mélanges lipide-protéine de diverses fractions molaires. Les deux problèmes majeurs de cette

méthodologie concernant la fabrication des films mixtes et la détermination de la concentration interfaciale de la protéine.

La déposition des lipides à l'interface air-eau ne pose pas de problème puisque ces molécules sont généralement solubles dans des solvants non-polaires qui se prêtent bien à leur étalement à l'interface. Les protéines solubles sont toutefois difficilement solubilisées dans ces solvants. Afin d'incorporer les protéines dans les films lipidiques, diverses méthodologies ont été élaborées. La plus simple de celles-ci consiste à laisser s'adsorber à l'interface lipide-eau la protéine initialement injectée dans la sous-phase (Wilkinson et coll. (1986)). Cette méthode présente deux inconvénients majeurs: l'incertitude de la quantité exacte de protéine atteignant l'interface et le temps requis afin d'atteindre un état d'équilibre; dans certains cas, l'équilibre prend plusieurs heures à être atteint (Graham (1980)). La seconde technique consiste à déposer successivement le film lipidique et le film protéique à l'interface air-eau. La protéine est généralement déposée directement à l'interface depuis une solution aqueuse (Davies et coll. (1984); Ivanova et coll. (1986); Urbaneja et coll. (1987)) ou dans une solution aqueuse contenant 0,1% d'alcool amylique (Taneva et coll. (1984)). Généralement la protéine est déposée en premier lieu puisqu'elle ne peut être étalée efficacement contre une pression de surface déjà existante. Cette méthodologie est nommée méthode de l'ajout successif. Puisque la déposition de la protéine et du lipide se fait localement et successivement, cette méthode offre le désavantage de ne pas favoriser l'homogénéité des films formés.

Les isothermes de pression de surface-aire moléculaire obtenues pour des films lipide-protéine de diverses fractions molaires sont analysées en considérant la loi d'additivité. Toute déviation de l'isotherme de mélange par

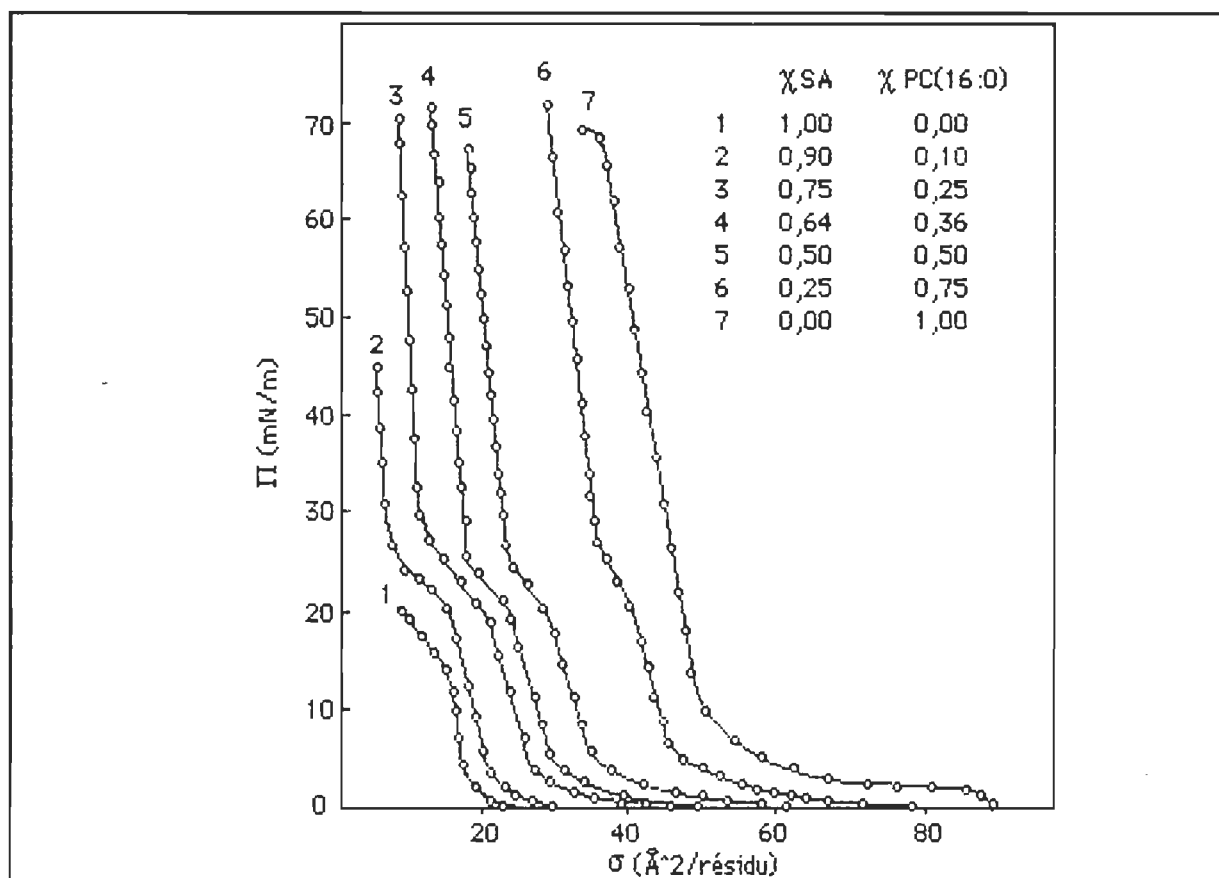


Figure 6. Isothermes de pression de surface (Π) en fonction de l'aire moléculaire (σ) pour l'albumine du sérum humain (1), la dipalmitoylphosphatidylcholine (7) et leur mélange de diverses compositions (2-6). Les aires moléculaires sont rapportées par résidu d'albumine sérique. Cette figure est tirée de Taneva et coll. (1984).

rapport à l'isotherme prédit pour un mélange idéal (calculée en considérant la somme pondérée des isothermes obtenues pour les deux corps purs) est interprétée comme une interaction entre les deux corps. Un exemple de ce type de mesure est donné à la Figure 6. Cette figure rapporte les isothermes obtenues pour l'albumine du sérum humain, la dipalmitoylphosphatidylcholine

(PC(16:0)) et pour des mélanges de diverses compositions. Ce résultat permet aux auteurs de conclure que la loi d'additivité est respectée pour les pressions de surface inférieures à 22 mN m^{-1} ; pour des pressions supérieures, l'expulsion graduelle de la protéine dans la sous-phase prend place. Bougis et coll. (1987) rapportent un comportement identique pour le mélange cardiotoxine (CTX IV)-didodécanylphosphatidylglycérol; la protéine est rapidement éjectée de la monocouche pour des pressions de surface supérieures à 22 mN m^{-1} . Dans le cas des systèmes lipide-protéine membranaire (glycophorine, cytochrome b5) peu importe la pression de surface à laquelle le film est soumis, la protéine demeure toujours présente dans le film insoluble (Davies et coll. (1984); Wilkinson et coll. (1986)).

Maintenant que les approches expérimentales ont été présentées, nous désirons donner quelques exemples où l'activité de surface et l'incorporation des protéines dans des couches lipidiques furent étudiées.

1.3.2 Activité de surface et incorporation des protéines dans les monocouches lipidiques

1.3.2.1 L'action des phospholipases sur les monocouches de lipide.

Les phospholipases ont un rôle d'hydrolyse des chaînes grasses ou de la tête polaire des lipides. Divers sites d'action spécifiques à diverses phospholipases ont été identifiés. L'organisation des monocouches en films compact permet de vérifier l'importance de l'accessibilité du site actif de l'enzyme pour son substrat. Un des paramètres majeurs contrôlant l'hydrolyse des phospholipides

par les phospholipases est la densité d'empaquetage des lipides dans la monocouche et, partant, la pression de surface. Dawson (1969) a montré que l'action de la phospholipase B sur une monocouche de ^{32}P -phosphatidylcholine est faible à 4 mN m^{-1} , plus rapide à 28 mN m^{-1} alors qu'elle devient presque nulle à 32 mN m^{-1} . Lorsque la pression de surface est diminuée de 32 à 31 mN m^{-1} , l'hydrolyse enzymatique se produit à nouveau. L'action de la phospholipase sur la monocouche lipidique est suivie par la variation de la pression, du potentiel et de la radioactivité de surface de la monocouche en fonction du temps. La grande influence de la pression de surface sur l'action de la phospholipase fut également rapportée par Demel (1982) qui a montré que la phospholipase C est incapable d'hydrolyser une monocouche de [^{14}C méthyl] palmitoyloléoylphosphatidylcholine comprimée à 35 mN m^{-1} , alors que l'hydrolyse se produit à une pression de surface de 30 mN m^{-1} . L'influence de facteurs tels la présence de Ca^{2+} et le pH de la sous-phase ont également été étudiés par Barque et Dervichian (1979).

Ces études démontrent clairement l'importance de la pression latérale de la monocouche lipidique sur l'action des phospholipases. Comme l'hydrolyse enzymatique requiert une géométrie de rencontre enzyme-substrat adéquate, une trop forte compression de la monocouche restreint l'accès de la protéine aux groupements du lipide qui sont présents au voisinage de la tête polaire. En fait, l'incidence de ces résultats est plus grande puisqu'elle pose également la problématique de la relation existant entre la pression de surface d'une monocouche et la pression latérale d'une bicouche ou d'une biomembrane. Les études menées avec les systèmes phospholipides-phospholipases par la

technique des monocouches mettent en évidence que l'action des phospholipases est inhibée lorsque les monocouches lipidiques sont comprimées à plus que 30 mN m^{-1} . Considérant que la tension interfaciale de certaines biomembranes et structures bilipidiques est d'à peine quelques mN m^{-1} , Gruen et Wolfe(1982) ainsi que Nagle(1986) considèrent que les monocouches doivent être comprimées à une pression de 50 mN m^{-1} afin de se trouver dans un état équivalent à celui des lipides organisés en bicouches. En utilisant des sondes fluorescentes, Fulford et Pell (1980) ont déterminé que la pression latérale de liposomes de diphénylhexatriène est supérieure à 60 mN m^{-1} pour un état condensé alors qu'une chute de 40 mN m^{-1} se produit lors du passage de l'état condensé à un état expansé. Il s'avère que bien peu de phospholipides peuvent être comprimés au delà de 45 mN m^{-1} ; le collapse de ces films se produit entre 40 et 45 mN m^{-1} . En plus, les résultats présentés sur l'action de surface des phospholipases sous-entendent qu'aucune activité hydrolytique ne peut être rencontrée pour de si fortes pressions. Ces résultats permettent de conclure que les conditions dans lesquelles une monocouche présente une conformation identique à celle retrouvée dans une bicouche n'est pas simple.

1.3.2.2 Les systèmes lipide-cytochrome c. Le cytochrome c est sans doute la protéine qui a été le plus largement utilisée afin d'étudier les interactions lipide-protéine par la technique des monocouches. L'abondance des études impliquant cette protéine provient sans doute de la disponibilité commerciale de cette protéine à une pureté satisfaisante et de la connaissance de la structure tridimensionnelle de cette protéine. Nous invitons le lecteur

intéressé aux aspects structuraux et évolutifs du cytochrome c à consulter l'article de Dickerson (1972).

Les interactions entre le cytochrome c et des monocouches de phosphatidylethanolamine (Quinn et Dawson (1969a)), de phosphatidylcholine, d'acide phosphatidique, de cardiolipine (Quinn et Dawson (1969b)), d'octadécylsulfate, d'octadécylphosphate, octadécanol, des acides octadécanoïque et octadécénoïque (Morse II et Deamer (1973)) ont été étudiées par la technique des monocouches.

En mesurant les cinétiques d'incorporation ($\Delta\Pi$ vs t) ou l'effet de l'état de compression de la monocouche de lipide (Π_{init}) sur l'incorporation du cytochrome c, Quinn et Dawson (1969a) ont montré que le cytochrome c s'incorpore dans les monocouches de phosphatidyléthanolamine comprimées à moins de 23 mN m^{-1} . Cependant, lorsque le film sur lequel le cytochrome c s'est adsorbé est comprimé à 40 mN m^{-1} , il est impossible d'expulser complètement la protéine. Les auteurs interprètent ce comportement comme le reflet de la dénaturation de surface de la protéine. Dans ce cas, comme tout au long de ce travail, le terme ambigu "dénaturation" référera à un changement conformationnel important et apparemment irréversible de la protéine aux interfaces. Les auteurs concluent que l'interaction entre la phosphatidyléthanolamine et le cytochrome c est de nature électrostatique puisque l'ajout de NaCl à une concentration finale de 1 M bloque l'adsorption de la protéine. Cependant une ambiguïté existe puisque même si l'adsorption (mesurée par un accroissement de la radioactivité de surface) cesse dans ces

conditions, l'incorporation de la protéine (mesurée par un accroissement de Π) continue.

Dans une étude subséquente, Quinn et Dawson (1969b) rapportent que le cytochrome c interagit avec des monocouches d'acide phosphatidique et de cardiolipine comprimées jusqu'à 45 mN m^{-1} . Cette incorporation peut être inhibée alors que du NaCl est ajouté à une concentration de 1 M dans la sous-phase. Un point obscur demeure inexpliqué puisque les auteurs montrent que l'incorporation est inversée alors que le NaCl est ajouté au système acide phosphatidique-cytochrome c. Le cytochrome c demeure cependant capable de s'incorporer dans de telles conditions à une monocouche d'acide phosphatidique comprimée à moins de 25 mN m^{-1} .

Dans ce même article, Quinn et Dawson rapportent que le cytochrome c peut s'incorporer dans une monocouche de phosphatidylcholine comprimée à moins de 20 mN m^{-1} . Cette incorporation est observée indépendamment du contenu ionique de la sous-phase, suggérant aux auteurs que cette interaction est de nature non-ionique.

Lorsque le cytochrome c est injecté sous des monocouches d'acide octadécanoïque, d'octadécylamine et d'octadécanol, il est incorporé aux diverses monocouches lorsque celles-ci sont comprimées à moins de 16 mN m^{-1} . Dans tous ces cas, la pression de surface mesurée à l'équilibre est de 16 mN m^{-1} , peu importe la pression de surface à laquelle la protéine fut injectée sous la monocouche (entre 0 et 16 mN m^{-1}). Pour ces trois films, le cytochrome c

apparaît posséder un rôle régulateur de la pression de surface; la position de l'équilibre étant définie par la pression de surface du film, indépendamment de la proportion des deux composants. Dans le cas de l'octadécylphosphate, cette pression de surface passe à 28 mN m^{-1} . Dans le cas de la monocouche d'acide octadécénoïque, les résultats dispersés suggèrent que la protéine puisse s'incorporer dans des monocouches comprimées jusqu'à 40 mN m^{-1} . Dans ce cas la pression de surface mesurée à l'équilibre n'est pas indépendante de l'état de compression initial du lipide, plus la pression de surface initiale de la monocouche de lipide est faible, plus la pression à l'équilibre du système lipide-protéine est faible. Le peu de résultats présentés pour le système octadécylsulfate-cytochrome c ne permettent pas d'établir l'état de compression maximal pour lequel l'incorporation du cytochrome c se produit.

Par mesure des potentiels de surface, Ksenzhek et coll. (1975) ont mis en évidence une désorption partielle du cytochrome c adsorbé sur une monocouche de lipides extraits de la cervelle de boeuf, alors que la sous-phase contient $0,1 \text{ M}$ de NaCl. La composition du lipide n'étant pas donnée dans l'article, nous ne pouvons pas dire si ce résultat est en accord ou non avec les résultats rapportés par Quinn et Dawson.

Teissié (1981) a étudié l'incorporation du cytochrome c dans des monocouches de dipalmitoylphosphatidylcholine, d'acide phosphatidique et d'un mélange des deux, par transfert d'énergie entre le cytochrome c et une sonde, la dansylphosphatidyléthanolamine, incorporée à une fraction molaire de 1% dans la monocouche. Ces auteurs montrent que l'incorporation du

cytochrome c dans les monocouches de dipalmitoylphosphatidylcholine est plus forte à 4 qu'à 30 mN m^{-1} . Le transfert non-nul d'énergie à une pression de 30 mN m^{-1} laisse croire que suite à l'éjection de la protéine de la monocouche causée par l'augmentation de la pression de surface, le cytochrome c s'organise dans une couche sous-jacente à la monocouche de lipide. De plus, cet auteur rapporte que l'attachement de la protéine à la monocouche de lipide est inversé alors que la concentration ionique de la sous-phase est accrue à 0,1 M de NaCl. Ce résultat est en contradiction avec le résultat de Quinn et Dawson voulant que l'attachement du cytochrome c à une monocouche de phosphatidylcholine ne soit pas affecté par un accroissement de la force ionique de la sous-phase. Tout comme Quinn et Dawson, Teissié rapporte que l'attachement du cytochrome c à une monocouche est accru alors que le film lipidique est chargé négativement.

L'incorporation de l'apocytochrome c dans les monocouches de dioleoylphosphatidylcholine, dioleoylphosphatidylsérine et de cardiolipine fut étudiée par Rietveld et coll. (1985). Dépendamment de la concentration de protéine utilisée, l'incorporation de l'apocytochrome c dans une monocouche de dioleoylphosphatidylcholine se produit alors que celle-ci est comprimée à moins de 20-30 mN m^{-1} . Pour la dioleoylphosphatidylsérine et la cardiolipine, l'incorporation de l'apocytochrome c se produit même lorsque les monocouches sont comprimées au delà de 30 mN m^{-1} . Ce dernier résultat suggère que l'interaction entre l'apoprotéine portant globalement 8 charges positives et la monocouche anionique soit électrostatique. La comparaison de cette étude avec celle de Quinn et Dawson est fort intéressante puisqu'elle permet de conclure

que le cytochrome c et son apoprotéine s'incorporent de façon identique dans des monocouches de nature voisine. Il est rapporté dans l'étude de Rietveld et coll. que la structure de l'apocytochrome c est très désordonnée comparativement au cytochrome c qui présente près du tiers de sa structure sous forme d'hélices- α . Il ressort donc de cette étude que la structure, de même que la présence du groupement hémique a peu d'importance dans la faible incorporation du cytochrome c dans une monocouche de phosphatidylcholine et dans la forte incorporation de cette protéine dans une monocouche de phosphatidylsérine et de cardiolipine.

1.3.2.3 Les systèmes lipide-albumine sérique . Les systèmes mixtes lipide-albumine sérique ont été caractérisés à l'interface air-eau pour l'intérêt qu'ils présentent dans la compréhension du comportement de la couche lipoprotéique du surfactant pulmonaire lors des cycles compression-expansion. Taneva et coll. (1984) présentent l'incorporation de l'albumine sérique sous la forme des traditionnels isothermes force-aire obtenues pour des mélanges de diverses compositions. Ces isothermes furent obtenues par déposition successive du lipide et de la protéine. Il apparaît qu'indépendamment de la fraction molaire d'albumine sérique, la protéine est graduellement éjectée du film lipidique alors que la pression de surface excède 22 mN m^{-1} . Au delà de 25 mN m^{-1} , l'éjection de l'albumine est complète et toute compression supplémentaire sert à comprimer le lipide. Ce système présente des cycles d'hystérèses qui sont caractéristiques d'une incorporation réversible de la protéine dans la monocouche de lipide. Le partitionnement de la protéine

entre la monocouche et la sous-phase est régi par la pression de surface de la monocouche.

1.3.2.4 Les systèmes lipide-colicine. La colicine A peut se fixer à la membrane interne bactérienne, dépolarisant celle-ci et causant une inhibition du transport actif. Cette protéine peut de plus former des canaux ioniques dans les bicouches planes. C'est en voulant apporter des explications sur le mécanisme d'insertion de la colicine dans les membranes que Pattus et coll. (1983) ont étudié la pénétration de cette protéine dans des monocouches de phosphatidylcholine, phosphatidylglycérol et de phosphatidyléthanolamine extraits de la membrane de *E. coli*. Ces auteurs rapportent que la pression maximale à laquelle la colicine s'incorpore dans la monocouche lipidique est de 25 mN m^{-1} pour la phosphatidylcholine, 31 mN m^{-1} pour la phosphatidyléthanolamine et de 43 mN m^{-1} pour le phosphatidylglycérol. Ces systèmes présentent une relation linéaire entre l'accroissement de la pression de surface et la pression de surface à laquelle le lipide est comprimé. Tout comme c'est le cas pour la majorité de ces graphiques, la pression finale mesurée suite à l'incorporation de la protéine dépend de l'état initial de compression du lipide. La présence de sel dans la sous-phase inhibe l'incorporation de la colicine dans les monocouches de phosphatidylglycérol, suggérant une interaction électrostatique entre les deux composés.

1.3.2.5 Les systèmes lipide-anticorps antilipide. La fixation de l'antigène et de l'anticorps constitue la première étape de l'interaction antigène-anticorps. La complémentarité spatiale des deux composés est le

principal facteur responsable de l'interaction. Les interactions entre le lipide A et l'antilipide A immunoglobuline G, le lipide A et l'immunoglobuline G normale ont été étudiées par Ivanova et coll. (1984) et Ivanova et coll. (1986). En mesurant les isothermes du mélange lipide-anticorps obtenues par addition successive de diverses fractions molaires des deux constituants, les auteurs montrent que l'interaction entre l'anticorps spécifique au lipide A est plus forte que l'interaction entre un anticorps non-spécifique et la monocouche de lipide. Cette spécificité d'interaction est expliquée par une plus grande hydrophobicité de l'anticorps antilipide A.

Une étude récente rapporte l'étude de l'interaction entre l'anticorps antilipide (TEPC 15) et des monocouches de phosphatidylcholine et de phosphatidyléthanolamine.(Urbaneja et coll. (1987)). Cette étude démontre d'une part la grande affinité de l'anticorps TEPC 15 pour des monocouches de phosphatidylcholine et de phosphatidyléthanolamine; alors que la pression de surface provenant de l'activité de surface de l'anticorps à l'interface air-eau est de moins de 2 mN m^{-1} , il peut pénétrer des monocouches de lipide comprimées à 20 mN m^{-1} . Les résultats présentés par ces auteurs traduisent l'augmentation de la surface provoquée par l'incorporation de l'anticorps dans une monocouche gardée à une pression de surface constante pour diverses fractions molaires anticorps-lipide. Ces fractions molaires sont calculées en considérant que la totalité du matériel déposé demeure à l'interface.

1.3.2.6 L'incorporation des protéines membranaires dans les monocouches de lipide. Les études présentées jusqu'à maintenant impliquaient

des protéines qui possèdent une activité de surface mais qui ne sont pas des composantes intégrales des membranes biologiques. Certaines études rapportent la caractérisation de l'incorporation entre des protéines ancrées à la membrane biologique et des monocouches de lipides. Il est à noter que l'utilisation de ces protéines en monocouche requiert la solubilisation de ces protéines qui sont généralement insolubles dans les solvants aqueux. Pour ce faire, il est nécessaire d'utiliser des détergents qui se fixent à la portion hydrophobe de la protéine. La réelle influence de ces détergents, qui sont tensioactifs, est rarement abordée. Nous présentons deux cas afin d'illustrer ces études.

A) Le système dipalmitoylphosphatidylcholine-glycophorine. La glycophorine est une glycoprotéine intrinsèque de la membrane de l'erythrocyte humain. Malgré la présence d'oligosaccharides constituant 60 % de sa masse, cette protéine est ancrée à la membrane de l'erythrocyte par un domaine hydrophobe de 22 résidus. Pour les considérations traitées à la section 1.2, c'est probablement sous forme d'hélice- α que ce segment traverse la membrane. Davies et ses collaborateurs (1984) ont étudié l'interaction de la glycophorine et de la dipalmitoylphosphatidylcholine étalée à l'interface air-eau. Les résultats présentés par ces auteurs prennent la forme d'isothermes de pression de surface-aire moléculaire mesurées pour des films mixtes de diverses compositions fabriqués par addition successive. Afin de minimiser la solubilité de la protéine dans la sous-phase, ces auteurs travaillent sur une sous-phase contenant 1,2 M de sulfate d'ammonium. La principale constatation de cette étude réside dans le fait que la transition de phase liquide expansé-

liquide condensé présentée par le lipide disparaît alors que les films mixtes lipide-protéine sont formés. En utilisant les isothermes de pression de surface-moléculaire obtenues pour des films de glycophorine seule (Davies et coll. (1983)), les auteurs constatent que les isothermes du mélange ne sont pas une simple moyenne pondérée des isothermes obtenues pour les corps purs (ce qui est fort normal considérant que le mélange ne présente plus de transition de phase). Sur cette base, ils concluent à l'existence d'une interaction entre la glycophorine et la dipalmitoylphosphatidylcholine.

B) Les systèmes lipide-cytochrome b₅. Le cytochrome b₅ présente une analogie structurale importante avec la glycophorine puisqu'il comporte également une portion hydrophile importante ancrée à la membrane par un court domaine hydrophobe. Wilkinson et coll. (1986) ont systématiquement étudié l'influence de la tête polaire et des chaînes grasses sur l'insertion du cytochrome b₅ dans des monocouches lipidiques. Cette étude rapporte que l'activité de surface de la protéine obéit à la gradation suivante: dipalmitoyl-acide phosphatidique < dipalmitoylphosphatidyléthanolamine < dipalmitoylphosphatidylcholine. En plus, l'activité de surface croît alors que les chaînes acyles du lipide présentent une longueur croissante. Egalement, la transition de phase observée pour la dipalmitoylphosphatidylcholine disparaît alors que la protéine est incorporée au film. Ce comportement fut également observé pour le système PC(16:0)-glycophorine.

Dans le cas des systèmes lipide-glycophorine et lipide-cytochrome b₅, il devient difficile de distinguer la simple activité de surface de la protéine et

l'affinité de la protéine pour le lipide. Dans le cas des systèmes lipide-anticorps, cette distinction fut bien faite puisque l'anticorps, qui ne peut générer une pression de surface supérieure à quelques mN m^{-1} , s'incorpore dans des couches lipidiques comprimées à 20 mN m^{-1} .

1.3.2.7 Un cas particulier d'interaction lipide-protéine: les systèmes chlorophylle-protéine. La chlorophylle a (chl a) est l'un des pigments clé servant à capturer et à canaliser l'énergie lumineuse vers les centres réactionnels photosynthétiques. Il apparaît que la majorité, sinon la totalité de ce pigment est complexée à des protéines (Markwell et coll. (1979); Van Buren (1985); Brecht (1986)). Malgré la quantité phénoménale de complexes chlorophylle-protéine extraits au cours des vingt dernières années, bien peu d'éléments furent apportés en regard de la spécificité de l'interaction chlorophylle-protéine. C'est en tentant de comprendre la spécificité des interactions chlorophylle-protéine que divers auteurs ont étudié l'incorporation de certaines protéines dans des monocouches de chlorophylle a. Cependant, les protéines utilisées ne sont pas celles qui se retrouvent naturellement complexées à la chlorophylle. Cette situation s'explique par le fait que les partenaires réels de la chlorophylle sont des protéines transmembranaires fortement hydrophobes. La nécessité d'utiliser des détergents tensio-actifs afin d'extraire ces protéines de la membrane naturelle rend complexe, voire impossible leur utilisation en monocouche.

L'étude de l'interaction entre la chlorophylle a et le cytochrome c fut rapportée par Aghion et coll. (1969), Chin et Brody (1976) et Hirsch et Brody

(1980). Dans ces études, la fabrication des films mixtes chlorophylle a-cytochrome c se fait par addition successive. Une déviation positive à la loi d'additivité est notée, suggérant aux auteurs qu'il y a une interaction entre les deux composés. Cependant, cette déduction fut faite en considérant que la totalité de la protéine initialement déposée est demeurée à l'interface. Un déplacement bathochromique du maximum d'absorption de la chl a dans le bleu de 683 à 687 nm est noté lorsque le pigment est mélangé au cyt c réduit.

Par la même procédure, Chin et Brody (1976) rapportent qu'une interaction existe entre le cytochrome f (cyt f) et la chl a. Le maximum d'interaction est observé pour un rapport chl a:cyt f de 1:2 pour le cytochrome f réduit alors qu'il passe à 1:1 pour le cytochrome f oxydé. Lorsque le complexe est illuminé, une contraction du film est observée, traduisant, selon les auteurs, une photoréaction du complexe chl a-cyt f.

L'étude de l'interaction entre la plastocyanine (pcy) et la chl a est rapportée par Brody (1973 et 1975). Vérifiant l'applicabilité de la loi d'additivité, l'auteur conclut à la formation d'un complexe de composition chl a:pcy de 1:2 pour la plastocyanine réduite et 1:1 pour la plastocyanine oxydée. En irradiant le complexe chl a-pcy réduite, une contraction du film suggère à l'auteur une photoréaction qui ne se produit qu'à l'interface azote-eau.

Par spectroscopie d'absorption, Ivanovskaya et coll. (1972) ont étudié les propriétés spectroscopiques des complexes chlorophylle a-albumine sérique et chlorophylle b-albumine sérique. Les auteurs rapportent que pour les deux

systèmes, les maxima d'absorption des chromophores ne sont pas affectés par la présence de la protéine. Cependant, la stabilité chimique des films de chlorophylle a et b est grandement accrue lorsque la protéine est ajoutée au système.

Nous avons de sérieuses réserves sur la procédure utilisée par Brody (1973 et 1975) et Chin et Brody (1976) afin d'établir la stoechiométrie des complexes chlorophylle-protéine. D'une part, ils ne peuvent avoir l'assurance, à moins d'utiliser la radioactivité de surface, que la totalité de la protéine initialement déposée est demeurée à l'interface. Davies et coll. (1984) rapportent que la glycophorine, une protéine possédant un caractère hydrophobe beaucoup plus marqué que la plastocyanine et le cytochrome c, se solubilise partiellement dans la sous-phase lorsque les films glycophorine-dipalmitoylphosphatidylcholine sont fabriqués par addition successive. De plus, les différences notées dans la stoechiométrie des complexes formés à partir des formes oxydées et réduites des protéines peuvent être la cause d'une plus ou moins grande solubilité des deux formes. Les études ne rapportent aucune vérification de cet effet.

1.4 Forces et faiblesses de la technique des monocouches appliquée à l'étude des interactions lipide-protéine.

Comme nous l'avons vu, la technique des monocouches fut appliquée à l'étude de nombreux systèmes lipide-protéine. Il ressort de ces études que la

technique des monocouches est bien adaptée à certaines études, alors que son applicabilité est plus faible dans d'autres cas. La principale force de cette technique réside dans le grand contrôle des paramètres auxquels le système est soumis. Il est possible d'identifier sélectivement l'influence de la pression latérale, de la nature du lipide, de la force ionique et du pH de la sous-phase et de mettre en évidence certains aspects déterminant la spécificité des interactions lipide-protéine. Comme nous l'avons mentionné, il est important de distinguer entre l'activité de surface de la protéine seule et l'interaction lipide-protéine. Dans certains cas où l'interaction lipide-protéine est inhibée en augmentant le contenu ionique de la sous-phase, il est possible de conclure à la nature électrostatique de l'interaction mais, comme nous le montrerons, peut être cet effet est la simple conséquence de l'augmentation de la solubilité de la protéine dans la sous-phase. Il en est de même de l'effet du pH où l'incorporation de la protéine dans la monocouche de lipide est généralement maximale au point isoélectrique de la protéine; condition où la solubilité de la protéine dans la sous-phase est minimale. Afin d'être complètes, ces études demandent l'utilisation conjointe de techniques permettant de mesurer l'influence des paramètres considérés sur la solubilité de la protéine.

Certaines faiblesses sont inhérentes à la stratégie expérimentale utilisée. Ainsi pour certains systèmes, il faut attendre plusieurs heures avant d'observer un équilibre apparent. Dans le cas de l'adsorption de la κ -caséine à l'interface air-eau, la pression d'équilibre est atteinte après une attente de 25 heures (De Feijter et coll. (1978)). De plus, les systèmes sont très peu comprimés lors de la mesure de ces cinétiques. Or, comme nous le montrerons

dans cette étude, la dénaturation des protéines est un mécanisme qui est optimal aux faibles états de compression. Notamment, la dénaturation de surface se manifeste par l'irréversibilité de l'incorporation qui, dans des conditions normales, est partiellement ou entièrement réversible.

Lors de la mesure des isothermes de pression de surface-aire moléculaire des mélanges lipide-protéine, il est généralement supposé que toute la protéine initialement déposée demeure confinée à l'interface et qu'elle y demeure présente tout au long de la compression. Le système dipalmitoylphosphatidylcholine- albumine du sérum humain (Taneva et coll. (1984)) est un exemple qui nous permet de constater que ce n'est pas toujours le cas. Comme il est impossible d'avoir l'assurance que la totalité de la protéine initialement déposée demeure présente en tout temps à l'interface, nous devons questionner les conditions dans lesquelles certains auteurs tentent d'appliquer la loi d'additivité qui est établie en considérant l'insolubilité des deux composants.

Finalement, la technique des monocouches permet de qualifier la nature des interactions lipide-protéine. Aucune des études que nous avons consultées n'apporte de quantification de ces interactions. Cependant, il existe un formalisme qui est couramment appliqué à la mesure de l'excès d'énergie libre résultant de l'interaction entre deux composés insolubles (Gaines (1966)). C'est sans doute parce qu'il prévoit que les composés demeurent en tout temps présents à l'interface air-eau que ce formalisme n'est pas appliqué aux systèmes lipide-protéine.

1.5 Proposition d'une procédure permettant de qualifier et de quantifier les interactions lipide-protéine.

Ce travail vise à vérifier l'applicabilité d'une procédure différente visant à qualifier et quantifier les interactions lipide-protéine en utilisant la technique des monocouches. La démarche dont nous nous inspirons vise à établir les propriétés de surface des mélanges dioléoylphosphatidylcholine (PC (18:1))-cytochrome c et chl a-cyt c. L'incorporation de la protéine dans les monocouches se fera en utilisant le système décrit par Dervichian et Barque (1979). Ce système présente l'avantage d'activer l'incorporation de la protéine et de permettre une répartition homogène de la protéine dans la monocouche. En mesurant et comparant les isothermes de pression de surface (Π)-aire moléculaire (σ), potentiel de surface (ΔV)- σ du lipide pur et du mélange lipide-protéine, nous désirons qualifier l'incorporation de la protéine dans la monocouche. Afin de quantifier la concentration interfaciale de la protéine, nous mesurerons la concentration interfaciale (Γ) du [^{14}C] cytochrome c par la mesure de la radioactivité de surface. Cette mesure nous permettra de vérifier pour tous les états de compression la portion de la surface occupée par la protéine. De plus, nous proposons d'analyser le comportement des systèmes mixtes lorsque ceux-ci sont soumis à des cycles expansion-compression. La réversibilité et l'influence de la pression de surface sur l'incorporation de la protéine permettra d'obtenir des informations supplémentaires sur la force de l'interaction.

Une procédure est généralement utilisée afin de mesurer l'excès d'énergie libre d'interaction de deux composés insolubles (Gaines (1966)). Nous voulons vérifier l'applicabilité de cette procédure à l'étude des systèmes mixtes lipide-protéine. Le formalisme généralement utilisé demande d'établir les isothermes Π - σ des deux composés alors qu'ils constituent des monocouches homogènes. Nous devons donc mesurer les propriétés interfaciales du cytochrome c. Nous proposons de qualifier les propriétés interfaciales du cytochrome c en mesurant les isothermes Π - σ , ΔV - σ et de déphasage ellipsométrique ($\delta\Delta$)- σ de films de cytochrome c étalés depuis des cristaux, une solution éthanol:eau (2:1, v:v) ou adsorbé à l'interface air-eau depuis la solution. Il sera possible de comparer le comportement interfacial des films de cyt c obtenus par ces trois procédures. La loi d'additivité sera également appliquée à l'interprétation des potentiels de surface.

Afin d'obtenir des informations complémentaires sur le système PC(18:1)-cyt c, nous mesurerons les isothermes ellipsométriques des corps purs et du mélange. L'interprétation de l'isotherme ellipsométrique des composés qui, comme la chlorophylle a, présentent de l'absorption optique est complexe. Pour cette raison, nous avons choisi les spectroscopies d'absorption et de fluorescence comme mesures complémentaires à l'étude du système chl a-cyt c.

Finalement, nous désirons étudier l'influence de la force ionique de la sous-phase sur l'incorporation du cyt c dans des monocouches de

phosphatidylcholine bovine (PC bovine). Nous en profiterons pour confronter nos résultats aux résultats contradictoires présentés par Quinn et Dawson (1969b) et Teissié (1981). L'étude des mélanges chl a-stellacyanine (scy), chl a-plastocyanine (pcy) et chl a-cytochrome f (cyt f) viendra compléter cette étude. Ces résultats seront traités en regard de la spécificité de l'interaction chlorophylle-protéine et de son incidence biologique.

CHAPITRE 2

METHODES EXPERIMENTALES

2.1 Pureté des produits utilisés

La technique des monocouches, comme la majorité des techniques expérimentales, demande qu'un certain nombre de paramètres soient parfaitement contrôlés. Parmi ces paramètres, nous pouvons citer la pureté des molécules étalées à l'interface et des produits servant à préparer la phase aqueuse. L'adsorption d'impuretés tensioactives à l'interface air-eau aurait pour effet de fausser les isothermes mesurées et, possiblement, de modifier les interactions prenant place dans la monocouche.

2.1.1 Pureté des produits servant à la préparation de la sous-phase. Les sels de phosphate (Na_2HPO_4 et NaH_2PO_4 , Sigma Chem. Co., St. Louis, MO), le Tris[hydroxyméthyl]aminométhane (Tris) de même que le Tris-HCl furent trouvés exempts d'impuretés pouvant altérer les isothermes obtenues. Pour ce faire, nous nous sommes assurés que, suite au remplissage du bassin par la solution tamponnée à une concentration de 10^{-3} M et après une attente de 30 minutes, aucune pression de surface n'est détectée lors d'une compression en blanc. Pour cette raison, ces produits furent utilisés sans purification supplémentaire. Dans certains cas, la force ionique de la sous-phase fut augmentée en ajoutant au tampon du chlorure de sodium (NaCl , Fischer Sci., Montréal, QC) jusqu'à une concentration de 1,0 M. Certaines expériences nous

ont montré que la pureté de 99,9% annoncée par le fabricant n'est pas suffisante afin que nous utilisions ce produit sans purification préalable. Comme la purification de ce produit constitue une part non-négligeable de ce travail, nous retraiterons ce point subséquent (voir la Section 2.2).

L'eau servant à la préparation des solutions tamponnées fut purifiée en deux étapes. La première étape consiste en une filtration de l'eau provenant de l'alimentation courante à l'aide d'un système Nanopure (Sybron-Barnstead, Boston, MA) comportant quatre filtres. Le premier élimine la matière organique, les deux suivants retiennent les ions, alors que le dernier exclut les particules dont le diamètre excède $0,2 \mu\text{m}$. Suite à cette étape, l'eau possède une résistivité spécifique supérieure à $16,5 \times 10^6 \Omega \text{ cm}$. La seconde purification consiste en une double distillation opérée sur un système en quartz (modèle bi-18, Heraeus-Schott, Hanau, Allemagne). Suite à la distillation, l'eau est conservée dans des contenants de verre fermés. Afin d'éviter toute contamination, les récipients contenant l'eau sont subséquentement manipulés avec des gants. La tension superficielle de l'eau suite à la distillation est de $71,0 \pm 0,4 \text{ dyne cm}^{-1}$, tel que mesuré selon la méthode de l'anneau de Du Noüy.

2.1.2 Préparation des protéines Cette étude concerne principalement les aspects structuraux des interactions lipide-protéine. Ainsi, les critères que nous avons choisi afin de vérifier la pureté des protéines reposent sur des propriétés structurelles et non fonctionnelles.

Le cytochrome c (type VI, Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) extrait du cœur de cheval fut utilisé sans purification supplémentaire. Il fut vérifié qu'aucune différence n'est notée entre un échantillon directement prélevé du contenant et un échantillon filtré sur un tamis moléculaire de Séphadex G-25 suite à son oxydation par le ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$, Fischer Sci., Montréal, QC). Cette manipulation vise deux buts: 1) s'assurer que notre échantillon est principalement composé de ferricytochrome c et 2) vérifier qu'il est dépourvu d'impuretés tensioactives de faible poids moléculaire. Comme les deux préparations ne présentent aucune différence dans leurs propriétés d'adsorption sur une monocouche de PC, le cyt c fut utilisé sans aucune purification supplémentaire. Pour les expériences de radioactivité de surface, la protéine fut méthylée au ^{14}C . Cette procédure est décrite en détail à la Section 2.1.2.1.

La plastocyanine et la stellacyanine nous furent gracieusement fournies par le Dr. A. English de l'Université Concordia (Montréal). Pour ces deux cupriprotéines, les échantillons nous étaient fournis à la concentration requise ($\approx 1 \text{ mg mL}^{-1}$). Les rapports de pureté spectroscopique A_{280}/A_{604} mesurés pour la stellacyanine et la plastocyanine étaient respectivement de 6,0 et 1,5. Comme les échantillons qui nous ont été fournis étaient déjà en solution, ils furent utilisés dans un maximum de trois jours suivant leur préparation. Cette mesure vise à minimiser la dégradation des protéines.

Le cyt f, provenant du navet, fut utilisé tel que fourni par Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO). Il fut montré par Willey et coll. (1984) que cet échantillon

est constitué de cyt f dont une section, possiblement transmembranaire, de 21 acides aminés est clivée lors de l'extraction de la protéine. Le cytochrome f est reconnu posséder les caractéristiques d'une protéine globulaire pour une fraction importante de son organisation. Ce n'est qu'une section suffisante de 21 acides aminés qui formerait un segment d'hélice- α transmembranaire, ancrant la protéine à la membrane. Ce court segment transmembranaire ainsi que 15 résidus de l'extrémité C-terminale seraient perdus lors de la préparation. Pour notre besoin, cette constatation comporte un avantage et un désavantage. L'avantage réside dans le fait que le système expérimental utilisé est conçu principalement pour étudier les associations entre une protéine soluble et une monocouche insoluble; les protéines qui possèdent un caractère hydrophobe marqué ont une forte tendance à s'adsorber à l'interface air-eau. Lorsque les protéines hydrophobes sont étudiées avec la technique des monocouches, il est pratiquement impossible de faire la distinction entre l'adsorption de celles-ci à l'interface air-eau et leur interaction avec la monocouche lipidique. Comme le cyt f composant notre échantillon est dépourvu de sa portion fortement non-polaire, cette protéine devient un candidat plus intéressant pour une étude en monocouche. Cependant, comme le cyt f ne présente pas la totalité de la séquence de sa forme native, nos conclusions perdront un peu de poids lorsque l'incidence biologique de l'interaction entre les deux composés sera abordée. Quoiqu'il en soit, nous croyons que ce système constitue une excellente amorce à la compréhension, à l'aide d'un système modèle, de la nature des interactions chlorophylle-protéine.

2.1.2.1 Méthylation du cytochrome c. Le [^{14}C] cytochrome c fut utilisé afin de déterminer la concentration interfaciale de la protéine (Γ) par la mesure de la radioactivité de surface. Le cytochrome c marqué fut préparé par méthylation de la protéine native selon la méthode modifiée de Jentoft et Dearborn (1979) rapportée par Phillips et Krebs (1986). Dans une expérience typique: 6,0 mL de tampon phosphate 0,05M de pH=7,5 et contenant 12 mg de cytochrome c; 0,8 mM de [^{14}C]formaldéhyde (52,5 mCi mmol $^{-1}$, NEN Products, Lachine, QC) et 8 mM de cyanoborohydrure de sodium (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) furent incubés à la température de la pièce durant 18 heures. Après oxydation du cytochrome c au ferricyanure de potassium, les réactifs excédentaires furent éliminés en dialysant l'échantillon deux fois contre 250 mL de tampon et en le filtrant ensuite sur un gel de Séphadex G-25 (Pharmacia Biotechnology Products, Dorval, QC). La concentration finale de la protéine fut déterminée selon la méthode de Bradford (1976) et son activité spécifique par scintillation en utilisant le [^{14}C] acide octadécanoïque (59 mCi mmol $^{-1}$) comme référence. Une activité spécifique de 3,4 $\mu\text{Ci mg}^{-1}$ fut déterminée pour le [^{14}C] cytochrome c. La protéine marquée fut utilisée dans les trois jours suivant sa préparation.

2.1.3 Pureté des lipides, de la chlorophylle a et de l'acide octadécanoïque. Comme il fut mentionné, la pureté des composés utilisés dans les études en monocouche est cruciale. Lorsque nous désirons caractériser une molécule étalée à l'interface air-eau, il est de première nécessité de s'assurer que cette molécule seule constitue le film et qu'aucune impureté ne provient de la sous-phase, de l'air ou de l'échantillon lui-même. Nous venons tout juste d'énumérer

les précautions prises afin de nous assurer qu'aucune contamination ne provient de la sous-phase. Quelles précautions furent prises afin de nous assurer de la pureté des échantillons qui constituent les films monomoléculaires?

Les méthodes chromatographiques sont toutes indiquées afin de vérifier la présence d'impuretés dans un échantillon. La technique la plus simple et la plus rapide permettant de vérifier la pureté d'un échantillon lipidique est sans conteste la chromatographie en couche mince (CCM). Pour la PC bovine (Milton Roy Ind., Rexdale, ON), la PC(18:1) (P.L. Biochemicals, Milwaukee, WI) et le [1- ^{14}C] acide octadécanoïque (59,0 mCi mmol $^{-1}$, NEN Products, Lachine, QC), la pureté des échantillons fut vérifiée en effectuant une chromatographie en couche mince sur des plaques de gel de silice (250 μm , Analtech. Inc., Newark, DE) préalablement nettoyées selon la méthode rapportée par Guay (1986). Le solvant de migration utilisé est un mélange chloroforme: méthanol: eau (65:25:4, v:v:v). Une fois la migration complétée, la plaque fut révélée en vaporisant une solution d'acide sulfurique à 5% v/v (Anachemia, Lachine, QC). Cette méthode offre l'avantage d'être non-sélective et de permettre la révélation de tous les constituants. Dans le cas de la PC bovine et de l'acide octadécanoïque, il fut trouvé que l'échantillon était pur. Dans le cas de la PC(18:1), un contaminant mineur de mobilité supérieure fut mis en évidence. Ce contaminant compose moins de 1% de l'échantillon.

L'extraction et la purification de la chlorophylle a demande beaucoup de soin et d'expérience. C'est pourquoi la chlorophylle a utilisée au cours de ce

travail nous fut fournie par G. Munger. Pour ce faire, une adaptation des méthodes d'Iriyama et coll. (1979), d'Omata et coll. (1980) et de Shiraki et coll. (1978) fut utilisée. La chlorophylle a est un composé extrêmement sensible à différents facteurs tels la lumière et l'oxygène. Pour ces raisons, certaines précautions furent prises. En tout temps: 1) l'échantillon solubilisé fut conservé sous atmosphère d'argon dans un vial hermétiquement fermé; 2) suite à la préparation de la solution, la pureté de l'échantillon fut immédiatement vérifiée par chromatographie en couche mince en utilisant un mélange hexane:acétone (7:3, v:v) comme solvant de migration; 3) l'échantillon fut remisé à la noirceur et les expériences furent menées sous éclairage vert tamisé; 4) l'échantillon solubilisé ne fut jamais utilisé dans des délais supérieurs à trois jours suivant sa préparation. Suite à la migration chromatographique, aucune révélation ne fut faite puisque la chlorophylle a et les composés analogues possèdent une forte coloration. La chl a fraîchement extraite présente trois taches; deux de celles-ci sont attribuables à la chl a et à la chl a', la dernière à la phé a. Lorsque la proportion de chl a' et/ou de phé a était trop importante, une purification supplémentaire de l'échantillon était accomplie jusqu'à ce que la chl a constitue plus de 95% de l'échantillon.

La phéophytine a (phé a) fut préparée dans nos laboratoires à partir de chl a. La phéophytinisation de la chl a fut accomplie selon la méthode de Perkins et Roberts (1962). La CCM nous révèle que la phé a est le seul constituant présent suite à la transformation.

Même si la chromatographie en couche mince présente une bonne sensibilité à la détection d'impuretés dans nos échantillons, nous avons voulu nous assurer, dans le cas de la PC bovine, la PC(18:1) et de l'acide octadécanoïque, de la pureté absolue de ces échantillons. La chromatographie en phase gazeuse permet une identification précise de la nature des chaînes hydrocarbonées composant l'échantillon. L'analyse des chaînes hydrocarbonées fut faite après transméthylation de l'échantillon. La procédure suivie fut déjà rapportée par Salesse et coll. (1983). Le chromatographe (modèle 3700, Varian Canada) fut programmé de la façon suivante: condition isotherme de la colonne à 170 °C durant 2 min. suivie d'un réchauffement linéaire jusqu'à 235 °C à raison de 3 °C min.⁻¹. La PC(18:1) est constituée à 98,3% de chaînes aliphatiques de 18 carbones comportant une insaturation (C_{18:1}); les principaux contaminants sont le C_{18:0} (0,4%), le C_{18:2} (0,1%) et le C_{18:3} (0,9%). La pureté de cet échantillon fut jugée suffisante. Le [1-¹⁴C] acide octadécanoïque comporte 97,3% de C_{18:0}; les principaux contaminants sont le C_{16:0} (0,4%), le C_{16:1} (2,0%) et le C_{18:3} (0,1%). Comme les isothermes de pression de surface sont avantageusement comparables avec celles rapportées dans la littérature (Abraham et coll. (1981); Hifeda et Rayfield (1985)), que le produit n'est disponible qu'en très faible quantité, qu'une purification de ce dernier entraînerait une incertitude concernant l'activité spécifique de l'échantillon et que nous devons précisément connaître cette valeur, nous avons utilisé l'échantillon tel que fourni par le fabricant.

La composition en chaînes grasses de la PC bovine fut également déterminée par chromatographie en phase gazeuse. Dans ce cas, la température de

l'injecteur fut fixée à 200 °C, celle du détecteur à 300 °C et la colonne fut opérée de façon isotherme à une température de 200 °C. A notre connaissance, cette analyse n'a jamais été rapportée dans la littérature. Par contre, la composition en chaînes aliphatiques de la PC extraite du jaune d'oeuf a été établie par au moins trois auteurs (Singleton et coll. (1965); Fukuzawa et coll. (1979); Bellemare (1986)). Pour fin de comparaison, nous présentons à la Table 2 le contenu en chaînes grasses de la PC d'oeuf et de la PC bovine. L'incertitude incluse dans nos résultats représente l'écart maximal par rapport à la valeur moyenne déterminée pour quatre chromatogrammes réalisés à partir de trois solutions différentes.

Tableau 2

Analyse par chromatographie en phase gazeuse de la composition en chaînes grasses de la phosphatidylcholine extraite de la cervelle de boeuf. Pour fin de comparaison, nous présentons également les compositions établies pour la phosphatidylcholine extraite du jaune d'oeuf.

<u>Identification</u>	<u>Symbole</u>	<u>PC bovine</u>	<u>PC oeuf</u>	<u>PC oeuf</u>	<u>PC oeuf</u>
Acide		(ce travail)	(1)	(2)	(3)
Tétradécanoïque	C _{14:0}	0,8 ± 0,2	-	-	-
Hexadécanoïque	C _{16:0}	36,5 ± 0,3	33,7	38,9	37,9
Hexadécénoïque	C _{16:1ω7}	3,8 ± 0,1	3,1	1,3	2,1
Octadécanoïque	C _{18:0}	10,3 ± 0,3	9,2	10,8	9,8
Octadécénoïque	C _{18:1ω9}	39,7 ± 0,4	32,9	33,4	34,0
Octadécadiénoïque	C _{18:2ω6}	0,6 ± 0,1	17,0	13,4	14,0
Octadécatriénoïque	C _{18:3ω3}	2,3 ± 0,1	-	-	-
Icosatriénoïque	C _{20:3ω6}	0,4 ± 0,1	-	-	-
Icosatétraénoïque	C _{20:4ω6}	2,0 ± 0,1	-	2,2	2,2
Docosanotétraénoïque	C _{22:4ω6}	0,6 ± 0,1	-	-	-
Docosanopentaénoïque	C _{22:5ω6}	0,4 ± 0,1	-	-	-
Docosanohexaénoïque	C _{22:6ω3}	0,6 ± 0,1	-	-	-
Inconnus	-	2,0 ± 0,3	4,1	-	-

(1) Singleton et coll. (1965)

(2) Fukuzawa et coll. (1979)

(3) Bellemare (1986)

2.2 Purification du NaCl pour son utilisation en monocouche

Nous avons déjà souligné l'importance de la pureté des produits qui entrent dans la préparation de la sous-phase. Dans le cas où les interactions électrostatiques sont soupçonnées être d'importance, il est de grand intérêt d'étudier l'influence de la force ionique de la sous-phase sur l'association lipide-protéine. Dans le cas de l'association du cyt c à une monocouche de phosphatidyléthanolamine, il fut montré par Quinn et Dawson (1969a) qu'en présence de NaCl à une concentration de 1 M, il est possible à forte pression de surface de renverser l'adsorption de la protéine sur la monocouche. Une telle concentration de NaCl rend nécessaire l'emploi d'un produit totalement exempt d'impuretés tensioactives, sinon l'effet mesuré peut bien être un artefact. En tentant de mener ce genre d'expériences, deux observations expérimentales nous ont suggéré que le NaCl doit être purifié avant son utilisation en monocouches. Premièrement, il fut constaté qu'une adsorption continue d'agents tensioactifs se produisait alors que la sous-phase contenait de fortes concentrations de NaCl non-purifié. Indirectement, ce phénomène se traduisait par un décalage des isothermes Π - σ du lipide pur; ce décalage était croissant avec l'augmentation de la force ionique de la sous-phase. Deuxièmement, la reproductibilité des isothermes obtenues à grande force ionique était de beaucoup inférieure à celle atteinte en absence de sel. Puisque la reproductibilité des isothermes de pression de surface est assujettie à trop de paramètres divers, il fut résolu à ce moment de trouver une méthode comparative nous permettant d'établir simplement et directement la pureté du sel.

Il est connu que l'accroissement de la concentration ionique d'une solution aqueuse conduit à une augmentation de sa tension de surface (γ). La valeur de γ de solutions aqueuses de NaCl est déjà connue (CRC Handbook of Chemistry and Physics (1982-83)). Donc, en confrontant les valeurs que nous mesurons avec les valeurs de la littérature, nous détenons un moyen direct de vérifier la pureté du NaCl. La Fig. 7A présente les valeurs de γ mesurées à l'aide d'un tensiomètre fonctionnant selon le principe de l'anneau de Du Noüy (modèle 20, Fischer Sci., Montréal, QC) pour des concentrations croissantes de NaCl. La figure présente également les valeurs rapportées dans la littérature. Il est à noter qu'à 20 °C, la solubilité du NaCl dans l'eau est de 36 g%(p/v). Il est facile de conclure à la lueur de ce résultat que le NaCl fourni commercialement n'est pas de pureté suffisante afin d'être utilisé en monocouche sans subir une purification préalable.

En consultant la littérature, il est possible de noter que plusieurs auteurs ont déjà été confrontés à ce problème. Quelques méthodes de purification ont été élaborées: rôtissage à 650 °C (MacRitchie (1985)) et précipitation d'une solution saturée par circulation de HCl(g) (Betts et Pethica (1956)). Nous avons testé trois méthodes différentes: 1) le rinçage avec une combinaison de solvants organiques; 2) la précipitation au HCl(g) et 3) l'extraction multiple au chloroforme.

2.2.1 Le rinçage aux solvants organiques. Cette technique consiste à faire circuler un certain nombre de fois plusieurs volumes de solvant organique

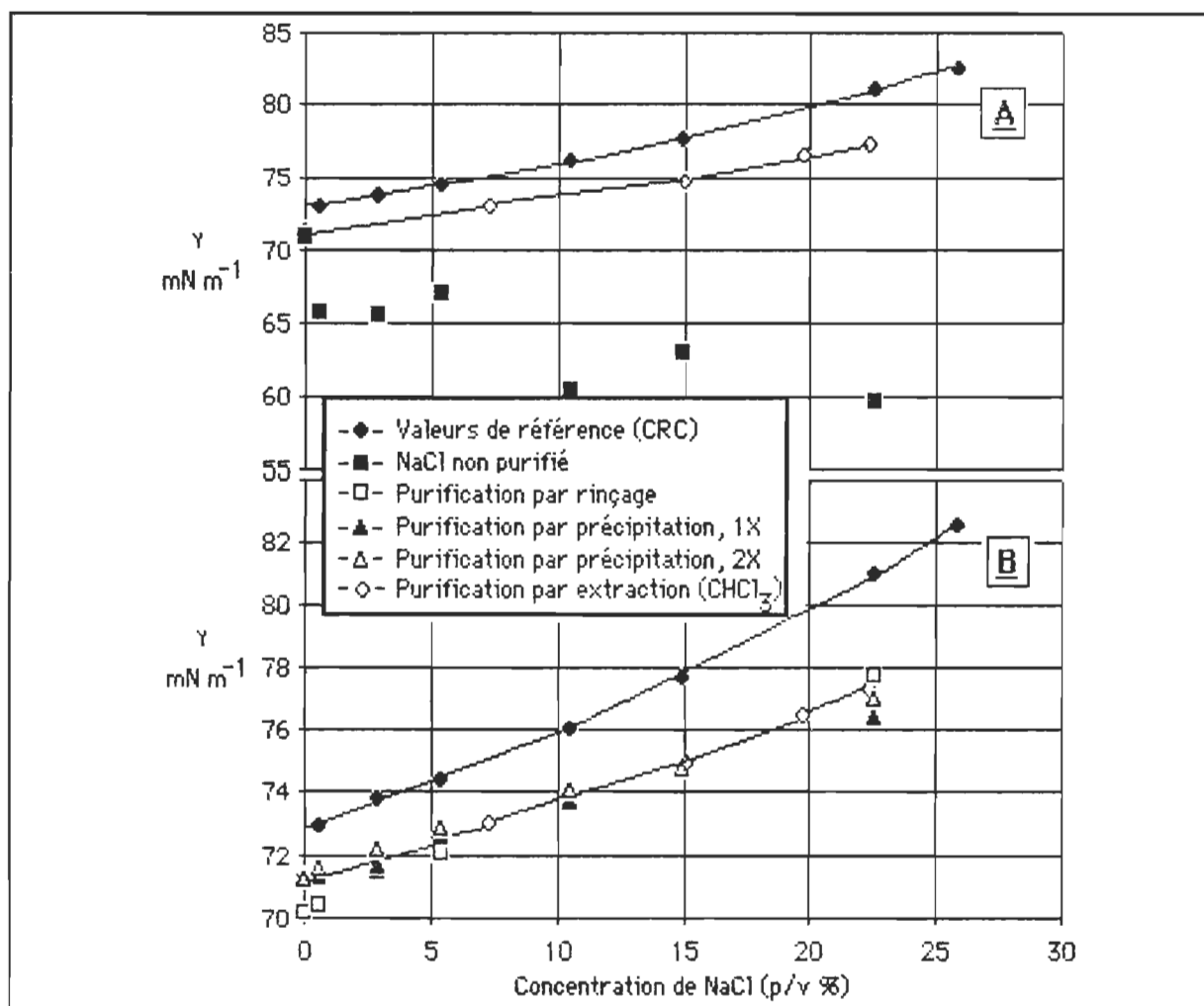


Figure 7. Vérification de la pureté du NaCl par mesure de la tension superficielle en fonction de la concentration en NaCl. A) Confrontation des valeurs rapportées dans le "CRC Handbook of Chemistry and Physics", et des valeurs mesurées pour le NaCl non-purifié et le NaCl purifié par extraction au chloroforme. B) Comparaison des résultats obtenus pour les trois méthodes de purification décrites dans le texte. Ces mesures furent faites à 20.0 ± 0.5 °C avec un tensiomètre Fischer (modèle 20).

dans un entonnoir contenant une certaine quantité de NaCl solide. Lors d'une purification, cinq rinçages de 100 mL étaient effectués dans un entonnoir à fond de verre fritté contenant 50 g de NaCl. Plusieurs solvants, ou combinaisons de solvants, furent utilisés. Dans tous les cas, des solvants de qualité chromatographique (Anachemia, Lachine, QC) étaient distillés sur une

colonne Vigreux de 60 cm avant leur utilisation. Le meilleur résultat fut obtenu en utilisant successivement le méthanol, l'acétone et le benzène. Lors de chaque changement de solvant, le solide est asséché en le plaçant 30 minutes dans une étuve chauffée à 100 °C.

2.2.2 La précipitation au HCl(g) . Une représentation schématique du montage expérimental utilisé afin d'effectuer la purification par précipitation au HCl(g) est donnée à la Fig. 8. Cette méthode consiste à faire précipiter une solution aqueuse saturée de NaCl en y faisant barboter du HCl gazeux. La

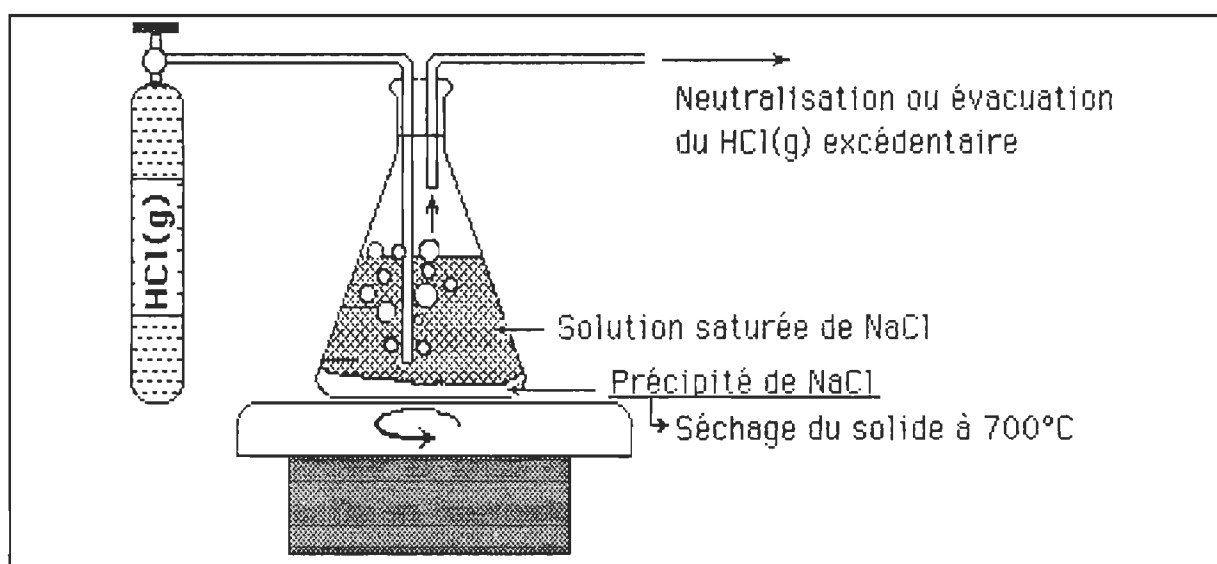


Figure 8. Représentation schématique du montage et des étapes de la purification du NaCl par précipitation au HCl(g) .

sursaturation en ions chlorure provoque une précipitation du NaCl . Suite à la précipitation, il est nécessaire d'éliminer la solution d'acide chlorhydrique concentré qui imbibe le précipité. Pour ce faire, le solide est placé 30 minutes dans un four chauffé à 650 °C. Comparativement à la méthode du rinçage,

cette méthode offre l'avantage de pouvoir, le cas échéant, éliminer les impuretés présentes dans la structure cristalline du solide. Cependant, l'étape d'assèchement enlève beaucoup d'attrait à cette méthode puisque le montage requis afin d'éliminer les vapeurs toxiques et réactives de HCl est très complexe. De plus, cette étape comporte le risque de permettre une contamination du solide purifié par les produits résultants de l'attaque du contenant et des parois du four par les vapeurs d'acide chlorhydrique.

2.2.3 L'extraction au chloroforme. Cette méthode est une simple adaptation de la méthode de partitionnement utilisée en chimie organique afin de séparer des produits en utilisant la solubilité dans divers solvants comme principe actif. Pour ce faire, une solution de NaCl quasi-saturée (32-36 g%, p/v) est préparée en utilisant de l'eau filtrée et distillée. Une fois cette solution versée dans une ampoule à décanter, un volume de chloroforme distillé est ajouté pour chaque trois volumes de solution saline. Après agitation et séparation des phases liquides, la phase inférieure (CHCl_3) est éliminée. Lors de l'élution, l'interface entre la phase aqueuse et la phase chloroformique est graduellement réduite à cause de la forme conique de l'ampoule. Il est notable qu'à la toute fin de l'élution, alors que la surface solution saline/chloroforme est minimale, un film opaque visqueux apparaît à l'interface lorsque le sel est contaminé. Il est important de s'assurer que ce film est éliminé avec la phase chloroformique lors de l'élution. Afin de s'assurer de l'absence d'impuretés, l'extraction est réamorcée jusqu'à ce que l'absence du film interfacial de contaminants soit observée trois fois consécutives. Alors, l'azéotrope $\text{CHCl}_3\text{:H}_2\text{O}$ (point d'ébullition: 56,1 °C) est éliminé en faisant bouillir la solution jusqu'à ce

que son point d'ébullition soit supérieur à 100 °C. La solution refroidie est conservée dans un récipient propre et fermé. La solution tamponnée est préparée en ajoutant la quantité requise de la solution saline concentrée au tampon. La concentration de la solution saline est déterminée en mesurant son indice de réfraction et en se rapportant aux valeurs de référence (CRC Handbook of Chemistry and Physics (1983-84)).

2.2.4 Confrontation des méthodes de purification du NaCl. La Fig. 7B présente les courbes γ -concentration de NaCl obtenues pour des solutions de NaCl ayant été purifiées 1) par rinçages successifs avec le méthanol, l'acétone et le benzène; 2) par simple et double précipitation au HCl(g) et 3) par extractions multiples au chloroforme. Nous pouvons constater qu'un écart non-négligeable existe entre nos valeurs et les valeurs de référence. En fait cette différence origine de la valeur absolue obtenue pour l'eau pure; nous obtenons $71,4 \pm 0,4$ dynes cm^{-1} alors que la valeur de référence est de 72,8 dynes cm^{-1} à 20°C. Cette différence peut être la cause de l'utilisation de méthodes de mesure différentes (Pallas et Pethica (1983)). Malheureusement, la méthode de mesure utilisée pour déterminer la valeur de γ rapportée dans le "CRC Handbook" n'est pas citée. Il ressort de ces résultats que les trois méthodes de purification sont équivalentes et que le fait de répéter la précipitation au HCl n'accroît pas significativement la qualité du produit. La méthode de rinçage aux solvants organiques, quoiqu'elle est simple, ne permet qu'une élimination superficielle des impuretés. La méthode de la précipitation au HCl(g), quoiqu'elle permette une purification complète, demande l'utilisation d'un montage complexe et l'étape d'assèchement du solide n'est pas totalement

exempte de contamination. En plus, à cause de sa grande réactivité chimique, le HCl(g) commercialement disponible n'est pas toujours de qualité suffisante. Puisque la méthode de l'extraction au chloroforme présente tous les avantages, c'est-à-dire simplicité, rapidité et efficacité, elle fut choisie afin de purifier le NaCl .

2.3 La technique des monocouches

L'organisation de certaines substances à la surface de l'eau est connue depuis la nuit des temps. Lors de fortes tempêtes, les pêcheurs répandaient des huiles autour des bateaux afin d'amoindrir l'effet des vagues (Gaines (1983)). Dans notre monde de connaissances, nous préférons parler des propriétés d'amortissement des vagues que possèdent les films minces. C'est Irving Langmuir qui a donné naissance à la science quantitative ayant pour but de décrire le comportement de certains types de molécules aux interfaces. Depuis le début du siècle, un nombre impressionnant de travaux rapportent l'étude du comportement interfacial de molécules diverses. Pour ne donner qu'une vague idée de l'apport considérable des connaissances qui découlent des travaux de Langmuir, nous référons le lecteur aux recueils des publications de cet auteur (Suits et Way (1961)); non moins de trois volumes traitent des propriétés de surface d'un grand nombre de molécules. Toutes ces molécules comportent une duplicité en présentant à la fois un caractère polaire et un caractère apolaire qui peuvent, ou non, être bien définis dans l'espace. L'appellation amphiphile réfère à des molécules qui présentent ce caractère

ambivalent. Une fois ces molécules étalées à l'interface air-eau, il est possible de les caractériser en mesurant les propriétés mécaniques (pression de surface), électriques (potentiel de surface) et optiques (ellipsométrie, absorption et fluorescence). De plus, lorsque ces molécules sont marquées avec un isotope radioactif, la radioactivité de surface fournit de précieuses informations concernant la densité interfaciale des molécules déposées à l'interface ou incorporées dans les monocouches depuis la sous-phase.

2.3.1 Généralités relatives à la technique. La technique des monocouches consiste à organiser à une interface un film dont l'épaisseur est inférieure ou égale à la longueur de la molécule choisie. Afin de caractériser les propriétés physiques de tels films, nous mesurons, une fois le film constitué, certaines propriétés mécaniques, électriques et optiques du film soumis à une compression. Comme la température est maintenue constante en cours de compression, la dénomination isotherme sera attribuée à ce type de résultat. Comme nous venons de le mentionner, les paramètres physiques sont mesurés pour divers états de compression du film. La façon la plus commode de quantifier l'état de compression du film sera d'exprimer l'aire moléculaire (σ) où:

$$\sigma = \Sigma/N \quad (2.1)$$

lorsque Σ est la surface totale disponible à la surface du bassin et N est le nombre total de molécules qui a été déposé. Lorsque Σ est exprimé en cm^2 et que N représente le nombre de molécules multiplié par 10^{-16} , alors σ , l'aire moléculaire obtenue par densimétrie, possède des unités de $\text{\AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$.

Pour faire référence à une analogie simple, ce paramètre est le pendant bi-dimensionnel du libre parcours moyen mesuré pour les molécules d'un gaz. Comme nous le verrons subséquemment, ce concept fondamental d'aire moléculaire peut, dans certaines conditions particulières, donner un mauvais reflet de la réalité (référer à l'Annexe A).

Le montage expérimental servant à mesurer les isothermes Π - σ , ΔV - σ et Γ - σ est illustré à la Fig. 9. Comme ce montage a déjà fait l'objet de nombreuses thèses et ouvrages (Guay (1986); Ducharme (1987); Salesse (1987) et Gaines (1966); Adamson (1967)), nous limiterons notre discours à une description sommaire des particularités de notre montage. Le bassin est fait d'aluminium et recouvert de Teflon autoadhésif (Fluorocarbon Dielectrix Division, Lockport, NY). Comme le bassin est recouvert d'un matériel hydrophobe, il est possible de le remplir de telle sorte qu'un ménisque excède le rebord supérieur du bain. La surface aqueuse est séparée en deux compartiments par le flotteur de mica (1) (12,6 x 0,6 cm). L'étanchéité des deux compartiments est assurée en reliant le flotteur aux parois du bain par de minces feuilles de Teflon (2) (0,0075 x 1,25 x 5 cm). Le compartiment à l'arrière du flotteur est en tout temps constitué d'une interface air-eau dépourvue de matériel tensioactif; c'est le compartiment de référence (3). C'est dans le compartiment compris entre le flotteur et la barrière mobile que nous étalerons les molécules. Nous dénommons cette surface le compartiment de travail (4). En déplaçant la barrière mobile (5), la surface disponible pour les molécules étalées dans le compartiment de travail est réduite. Comme dans certains cas, des protéines solubles furent injectées dans la sous-phase, nous nous sommes assurés

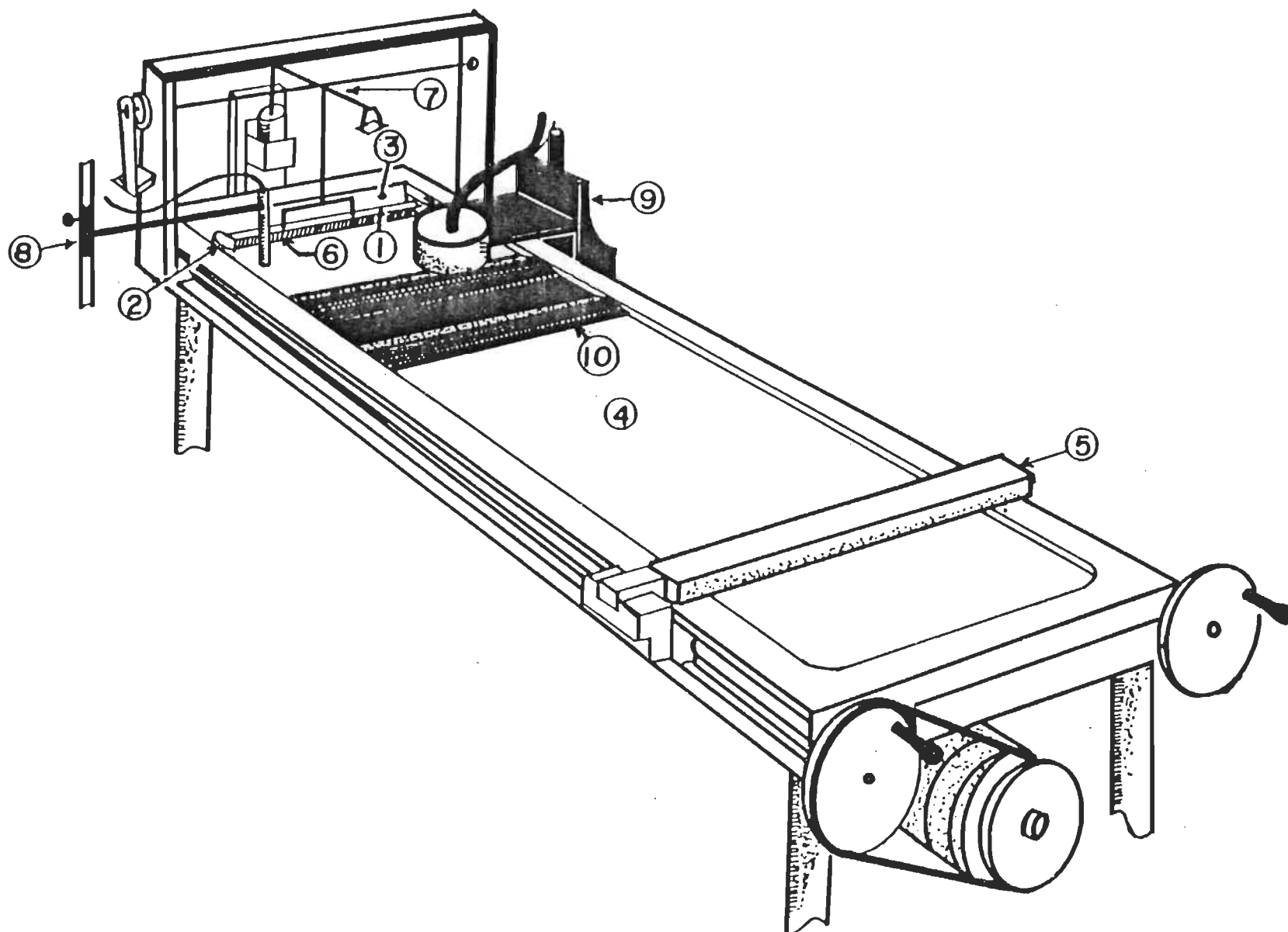


Figure 9. Représentation schématique du bassin de Langmuir servant à mesurer les isothermes Π - σ , ΔV - σ et Γ - σ . L'identification des composantes est faite dans le texte.

qu'elles ne pouvaient atteindre le compartiment de référence en fixant sous le flotteur une cloison (6) s'étalant depuis le fond du bain jusqu'à 2 mm sous le niveau normal de l'eau. Cette cloison est faite en aluminium recouvert de Teflon. La balance de force de Langmuir (7) permet de mesurer la pression de surface exercée par le film durant la compression. En plus, le potentiel électrique de l'interface est mesuré à l'aide de l'électrode de potentiel de surface (8) et la concentration interfaciale de molécules marquées à l'aide du détecteur de radioactivité (9). Un système de prismes (10) est utilisé afin d'activer l'incorporation de la protéine et d'homogénéiser le contenu de la sous-phase. Le détail de ces systèmes est donné dans les sections suivantes.

Pour l'ensemble des expériences rapportées dans cette étude, trois bassins furent utilisés. Le premier bassin possède une dimension de 32 x 14,7 x 1,0 cm et la position zéro du flotteur est à 4,5 cm du bord du bassin. Le second bassin possède la même dimension que le premier sauf pour la profondeur; un double fond ajouté au bassin réduit la profondeur à 0,5 cm. Ce système vise à réduire la quantité de protéine devant être injectée de moitié tout en conservant la même surface. Le second bassin fut utilisé pour les systèmes chl a-stellacyanine et chl a-plastocyanine et chl a-cytochrome f. Le troisième bassin est le système que nous avons mis au point afin de mesurer la pression, le potentiel et la radioactivité de surface. Comme les détecteurs de potentiel et de radioactivité de surface occupent une portion importante de la surface, il est impossible d'approcher la barrière mobile à moins de 12 cm du flotteur. Afin d'obtenir des isothermes complets commençant à pression de surface nulle et présentant, en fin de compression, le collapse, nous avons dû

allonger le bassin. La dimension de ce dernier est de 50 x 14,7 x 1,0 cm. En incluant le système de prismes, ces bassins ont respectivement des volumes de 350, 180 et 600 mL.

2.3.2 La déposition des films monomoléculaires. Les films d'acide octadécanoïque, de PC (18:1), de PC bovine, de chl a et de phé a sont déposés à partir de solution de benzène. Le solvant d'étalement est préalablement distillé. Dans tous ces cas, le benzène est indiqué comme solvant d'étalement puisqu'il solubilise bien ces molécules, s'étale, s'évapore rapidement et est très peu miscible dans l'eau.

Dans le cas des films de cytochrome c, trois méthodes d'étalement sont utilisées. La première consiste à déposer quantitativement des cristaux à l'interface air-eau. La quantité de protéine déposée est déterminée par la différence de masse d'un cupule à partir duquel les cristaux sont délicatement déposés à l'interface air-eau. La seconde méthode consiste à étaler quantitativement une solution éthanol:eau (2:1, v:v) de cytochrome c. La solution est préparée en solubilisant d'abord le cyt c dans l'eau et en ajoutant ensuite l'éthanol. Les isothermes obtenues par cette méthode sont les plus reproductibles qui furent obtenues ($\pm 7\%$). La dernière méthode consiste à injecter le cyt c dans la sous-phase et attendre 30 minutes qu'une certaine quantité de protéine ait atteint l'interface. Comme il est impossible de déterminer la quantité de protéine adsorbée à l'interface, les isothermes obtenues par cette méthode ne sont pas quantitatifs.

2.3.3 La pression de surface. La notion de pression de surface réfère au changement d'énergie libre par unité de surface produit par l'organisation d'une couche moléculaire à cette interface. Par définition, la pression de surface (Π) à l'interface air-eau est donnée par la relation:

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad (2.2)$$

où γ_0 est la tension superficielle de l'eau pure et γ est la tension de surface mesurée lorsque l'eau est recouverte d'un film tensioactif présent dans un état de compression donné. Une des caractéristiques importantes des molécules amphiphiles est l'organisation qu'elles adoptent à l'interface air-eau. Pour la majorité des lipides, les portions hydrophile et hydrophobe sont bien distinctes. Dans ce cas, le bilan des forces attractives et répulsives favorisent une organisation telle que les interactions entre la tête polaire et la sous-phase soient maximisées; à cause de leur faible affinité pour l'eau, les chaînes hydrocarbonées s'associent en formant une phase excluant l'eau. L'organisation des molécules présentes dans un état de compression donné sera déterminée par une fine balance de ces deux forces antagonistes. Lorsque nous soumettons un film lipidique à une compression, un travail doit être fourni afin de diminuer l'espace moléculaire moyen. La représentation graphique de ce travail, exprimé en fonction de l'aire moléculaire moyen tel que défini à l'Eq. 2.1 est appelée isotherme de pression de surface (Π)-aire moléculaire (σ). Ce type de résultat constitue l'essentiel de ce travail.

2.3.3.1 La mesure de la pression de surface. La Figure 10 donne une représentation simplifiée des caractéristiques de la balance de Langmuir

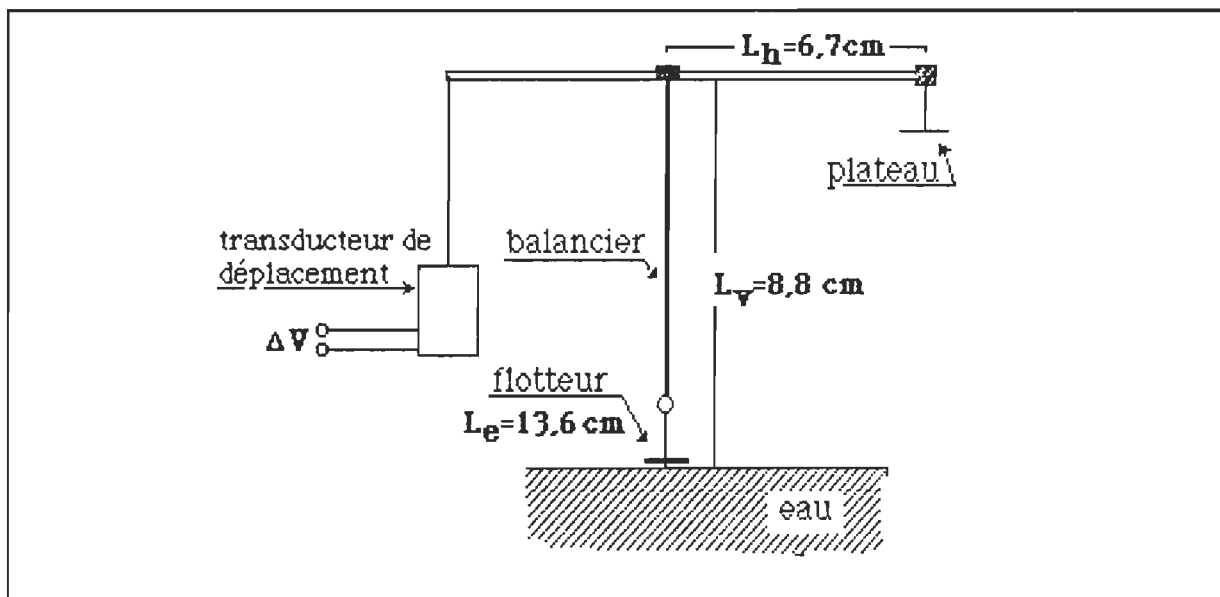


Figure 10. Représentation schématique de la balance de Langmuir servant à mesurer la pression de surface. Sont indiquées sur cette figure les dimensions de la balance utilisée dans cette étude.

utilisée dans cette étude. Une des extrémités du balancier présente un plateau pouvant porter des poids étalonnés, permettant la calibration de la balance. L'autre extrémité est couplée à un transducteur linéaire de déplacement (modèle 7 DCDT-050, Hewlett-Packard). Le transducteur permet de mesurer l'amplitude du déplacement de la balance sous l'action d'une force. Pour les faibles déflexions de la balance, le signal, mesuré aux bornes du transducteur à l'aide d'un multimètre, présente une relation linéaire avec la force appliquée. Il fut vérifié que les mesures de Π sont prises dans cette région de linéarité. La force de rappel du fil de torsion fut choisie afin que la tension mesurée à la pression de collapse des différentes molécules étudiées soit moindre que la tension mesurée à la limite maximale de linéarité de la balance.

La sensibilité (S) de la balance fut calculé selon la relation:

$$S = \frac{m g L_h}{L_v L_e} \quad (2.3)$$

où m est la pente de la courbe de calibration obtenue en mesurant la tension développée aux bornes du transducteur alors que diverses masses sont déposées sur le plateau de calibration; g est l'accélération gravitationnelle (9,8 m sec⁻²); L_h et L_v sont les longueurs horizontale et verticale des bras du balancier alors que L_e est la longueur effective du flotteur, i.e la longueur du flotteur + 0,5(largeur du bain - longueur du flotteur). Lorsque m est exprimé en grammes Volt⁻¹, g en mètre seconde⁻², L_h, L_v et L_e en m, alors S présente des unités de milliNewton m⁻¹ V⁻¹. Pour les deux premiers bassins, la sensibilité est de l'ordre de 12 mN m⁻¹V⁻¹, alors qu'elle est de l'ordre de 42 mN m⁻¹V⁻¹ pour le bassin utilisé afin de faire les mesures de radioactivité.

2.3.4 Le potentiel de surface. Si nous nous plaçons de part et d'autres de l'interface, il est possible de mesurer une différence de potentiel électrique caractéristique de cette interface. Lorsque nous déposons une couche monomoléculaire, le potentiel de l'interface est modifié en raison de la présence d'une nouvelle espèce moléculaire et de la modification de l'orientation des molécules d'eau qui contribuent au potentiel de référence. Cette modification du potentiel de référence est causée par l'interaction entre les molécules d'eau présentes à l'interface et la portion polaire du film monomoléculaire. Dans le cas où deux plaques parallèles conductrices portant

une densité de charge σ' sont séparées d'une distance d , la différence de potentiel ΔV est exprimée par:

$$\Delta V = \sigma' d / \epsilon_0 D \quad (2.4)$$

où $\epsilon_0 D$ est la constante diélectrique absolue du milieu. Il est possible de simuler le comportement électrique de l'interface en conférant à notre système le comportement d'un condensateur plan. L'approximation majeure de ce modèle consiste à considérer que la séparation des charges provoquée par la présence d'un dipôle, de moment dipolaire effectif $\bar{\mu}$, simule adéquatement le condensateur parallèle plan. Cette situation est illustrée à la Fig. 11. S'il y a n de ces molécules par cm^2 , alors $\sigma'd = ned = n \bar{\mu}$, e étant la charge électronique et $\bar{\mu}$ le moment dipolaire effectif. Lorsqu'exprimée en fonction de $\bar{\mu}$, l'équation 2.4 devient:

$$\bar{\mu} = \mu_{\perp} = \Delta V \epsilon_0 D / n = \Delta V \sigma \epsilon_0 D \quad (2.5)$$

où σ est l'aire occupée par chaque molécule et μ_{\perp} est la projection de l'amplitude du moment dipolaire sur un axe perpendiculaire au plan de l'interface. La permittivité du vide vaut $1,11 \times 10^{-10} \text{ Coulombs}^2 \text{ mètre}^{-2} (\text{Newton} \times 4\pi)^{-1}$. Lorsque ΔV est exprimé en millivolt et σ en $\text{\AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$, alors μ_{\perp} exprimé en C m ($\mu_{\perp}(\text{Cm})$) est donné par:

$$\mu_{\perp}(\text{Cm}) = \frac{\Delta V \sigma'}{4\pi} \times 10^{-23} \left[\frac{\text{V m}^2 \text{ molécule}}{\text{mV \AA}^2} \right] \times 1,11 \times 10^{-10} \left[\frac{\text{C}^2}{\text{N m}^2} \right] \times D \quad (2.6)$$

Comme 1 Debye est équivalent à $0,33 \times 10^{-29} \text{ C m}$, il est possible de réécrire l'Eq. 2.6 en considérant l'approximation couramment admise que D , la constante diélectrique relative du milieu vaut l'unité et exprimant μ_L en mD ($\mu_L(\text{mD})$),

$$\mu_L(\text{mD}) = \frac{\Delta V \sigma'}{12\pi} \left[\frac{\text{V m}^2 \text{ molécule}}{\text{mV Å}^2} \right] \left[\frac{\text{C}^2}{\text{N m}^2} \right] \left[\frac{\text{mD}}{\text{C m}} \right] \quad (2.7)$$

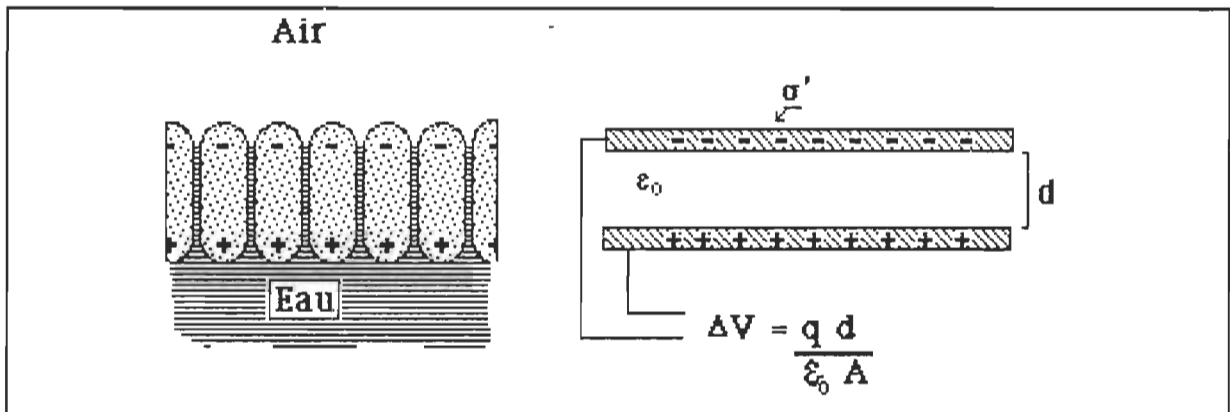


Figure 11. Représentation schématique de l'équivalence entre l'arrangement d'une série de dipôles à l'interface air-eau et d'un condensateur plan portant une densité superficielle de charges, σ' . Les plaques sont séparées d'une distance d .

Il est à noter que même si cette forme de l'expression est en accord avec les formes citées dans la littérature (Gaines (1966); Adamson (1967)), les auteurs omettent de mentionner que des unités de $\text{C}^2 \text{ N}^{-1} \text{ m}^{-2}$ sont sous-entendues dans l'expression 2.7. De plus, cette expression suppose que la permittivité du milieu séparant les centres de charges positif et négatif du dipôle est celle du vide.

2.3.4.1 La mesure du potentiel de surface. Les potentiels de surface sont mesurés selon la méthode de l'ionisation (Gaines (1966)). Pour ce faire, une électrode radioactive de ^{241}Am (Nuclear Radiation Development, Grand Island, NY) est placée à une distance pouvant varier entre deux et trois millimètres de la surface aqueuse. Par ionisation de l'air, l'électrode permet d'établir le contact électrique entre l'air et la sous-phase. L'électrode radioactive et une électrode de référence baignant dans le compartiment de référence sont branchées à l'entrée d'un électromètre (modèle 615, Keithley Instruments) afin de mesurer le potentiel qui existe entre celles-ci.

Avant toute expérience, une fois le bain nettoyé, l'électrode est positionnée au-dessus de la surface et, après avoir laissé le temps au système de se stabiliser, le potentiel de référence (V_0) est mesuré. Il fut vérifié que cette valeur est stable dans le temps. Pour ce faire, l'électrode fut laissée au-dessus de la surface propre durant une heure. Lorsque les conditions expérimentales sont excellentes (voir ci-après), le potentiel de surface ne varie pas de plus de ± 5 mV. Lorsque le potentiel de référence est stable, le matériel est déposé à l'interface et les potentiels sont mesurés pour divers états de compression du film. Le potentiel de surface (ΔV) est défini comme étant la différence entre le potentiel mesuré pour le film comprimé dans un état donné et le potentiel de référence (V_0).

Il est important de s'assurer de la stabilité du potentiel de référence. Si la valeur de V_0 dérive de façon significative durant le déroulement de l'expérience, les potentiels de surfaces mesurés se trouvent faussés. Nous

avons remarqué que lorsque l'électrode qui repose une nuit à l'air ambiant est positionnée au-dessus de la surface aqueuse nettoyée, le potentiel de référence peut varier de plus de 150 mV en 45 minutes. Cette dérive est énorme si l'on considère que certaines isothermes de potentiel de surface présentent une variation totale de ΔV de cet ordre. Il semble que l'hydratation de l'électrode est très importante puisque cette dérive n'est que de 20 mV lorsque, entre les expériences, l'électrode est remise au-dessus d'une surface aqueuse. Pour cette raison, l'électrode est toujours conservée au-dessus d'un récipient d'eau et nous laissons le potentiel se stabiliser durant 30 minutes avant une expérience.

2.3.5 La radioactivité de surface. La méthode de radioactivité de surface fut utilisée dans le passé afin de vérifier l'effet des solvants d'étalement sur l'état d'agrégation des monocouches (Cook et Ries (1956)), l'adsorption d'ions et de protéines à l'interface air-eau et lipide-eau (Quinn et Dawson (1969a,b;1970); Graham et Phillips (1979a,b); MacRitchie et Ter-Minassian-Saraga (1983)). Deux principes de détection permettent d'obtenir la mesure directe de la radioactivité: le comptage par scintillation et l'ionisation de gaz.

Le comptage par scintillation requiert la désactivation du rayonnement par interaction avec un milieu qui réémettra une part importante de l'énergie absorbée par émission de photons. Le principal avantage de cette technique réside dans sa grande efficacité de détection. D'une part, le rayonnement émis dans toutes les directions contribue à la production du signal lumineux. D'autre part, il y a peu d'atténuation puisque le rayonnement est produit dans le

milieu même où est générée l'émission de la lumière. Pour les compteurs à scintillation, il est généralement possible d'obtenir des rendements de comptage compris entre 70 et 90%. Malheureusement, ce principe de mesure est peu adapté aux études effectuées à l'interface air-eau. La seule façon d'utiliser ce principe de détection est de transférer la monocouche sur une lame et de doser la radioactivité provenant de cette lame. Cette alternative nous apparaît inappropriée étant donné que la mesure est indirecte et qu'un certain doute peut subsister en ce qui concerne la conservation de l'intégrité structurale lors de l'étape de transfert sur un support solide.

Dans le cas des détecteurs à gaz, le rayonnement qui pénètre dans le détecteur provoque l'ionisation et l'excitation des molécules de gaz qui se trouvent sur son parcours. Une différence de potentiel suffisante, appliquée entre l'anode et la cathode, permet la séparation et la collection des charges créées lors de l'ionisation. L'amplitude des impulsions collectées aux bornes du tube est proportionnelle à l'énergie du rayonnement alors que la fréquence de ces impulsions est proportionnelle à l'activité de la source émettrice. Ce système, quoiqu'il présente l'avantage de pouvoir être utilisé dans des conditions d'opérations très diverses, est cependant très peu efficace. La théorie limite le rendement de détection maximal à 50% puisque la moitié du rayonnement est émise en direction opposée du détecteur et est absorbée par l'eau. L'efficacité de ces systèmes utilisés en monocouches varie de 10 à 15% (Phillips et Krebs (1986); Quinn et Dawson (1970)). Comme ce système est le seul qui permet une mesure directe de la radioactivité interfaciale, c'est celui

qui fut choisi. La conception, la mise au point et la calibration du système de radioactivité de surface sont rapportées à la section 2.4.

Lors de l'étude des isothermes de radioactivité-aire moléculaire de l'acide octadécanoïque, nous avons utilisé diverses surfaces actives de détecteur. Un porte-cache adapté à l'entrée du détecteur permet d'insérer des masques de diverses surfaces. Comme le pouvoir de pénétration du rayonnement β^- du ^{14}C est faible (50 μm pour Al), les caches furent simplement fabriqués dans une feuille de Formica de 1 mm d'épaisseur. Des surfaces actives de 1,0; 5,7 et 10 cm^2 furent utilisées. Lorsque la surface du détecteur est entièrement découverte, la surface active est de 25,5 cm^2 .

2.3.6 L'ellipsométrie de surface. Dans le cas du système PC(18:1)-cyt c, l'ellipsométrie de surface fut utilisée comme méthode complémentaire. Dans ce cas, les mesures furent réalisées sur le système conçu et mis au point par Ducharme (1987). La lumière provient d'un laser He-Ne ($\lambda=632,8 \text{ nm}$) de 5mW et l'angle d'incidence ϕ est de $60,00 \pm 0,05^\circ$. Dans le cas de ces mesures, vu la nécessité d'interrompre la compression lors de la mesure expérimentale, les isothermes obtenues sont discontinues. Lors de ces mesures, la même procédure d'incorporation des protéines que celle rapportée dans la section suivante fut utilisée.

2.3.7 Incorporation de protéines dans les couches monomoléculaires. Le temps requis afin que l'adsorption d'une protéine atteigne un état d'équilibre apparent peut être significatif. A titre d'exemple, nous mentionnerons que

dans le cas de l'adsorption de la κ -caséine à l'interface air-eau, un temps de 24 heures est requis afin que la concentration interfaciale atteigne un maximum (DeFeijter et coll. (1978)). L'adsorption, utilisée comme seul mécanisme d'incorporation, peut présenter un grand désavantage sur de longues périodes puisque la dénaturation des protéines est un processus effectif à faible pression de surface. Nous discuterons plus en détail de ce point subséquemment. Idéalement, l'adsorption et l'incorporation des protéines se doivent d'être aussi rapides que possible. L'agitation de la sous-phase permet d'activer l'arrivée des protéines à l'interface air-eau ou air-lipide. Nous avons utilisé le système d'agitation mécanique rapporté par Dervichian (1979). Ce système est composé d'un triple prisme occupant toute la largeur du bain. La hauteur du système fut choisie de telle sorte que les arêtes supérieures du prisme effleurent l'interface. Pour le système que nous avons utilisé, les arêtes sont positionnées 2 mm sous l'interface. En déplaçant ce système dans le bain, tout le contenu de la sous-phase est forcé de circuler près de la surface. Ce système permet donc d'homogénéiser la sous-phase suite à l'injection de la protéine et d'activer, le cas échéant, l'adsorption et l'incorporation de la protéine dans la monocouche. En mesurant les cinétiques d'adsorption ΔV -t du cyt c, nous avons pu constater que dix agitations effectuées en moins de quinze minutes donnent le même résultat que les cinq heures requises afin d'atteindre le ΔV d'équilibre. Ce résultat traduit la grande efficacité de cette méthode d'incorporation.

La Fig. 12 présente la correspondance entre les étapes expérimentales et la présentation graphique des isothermes de pression de surface. La corres-

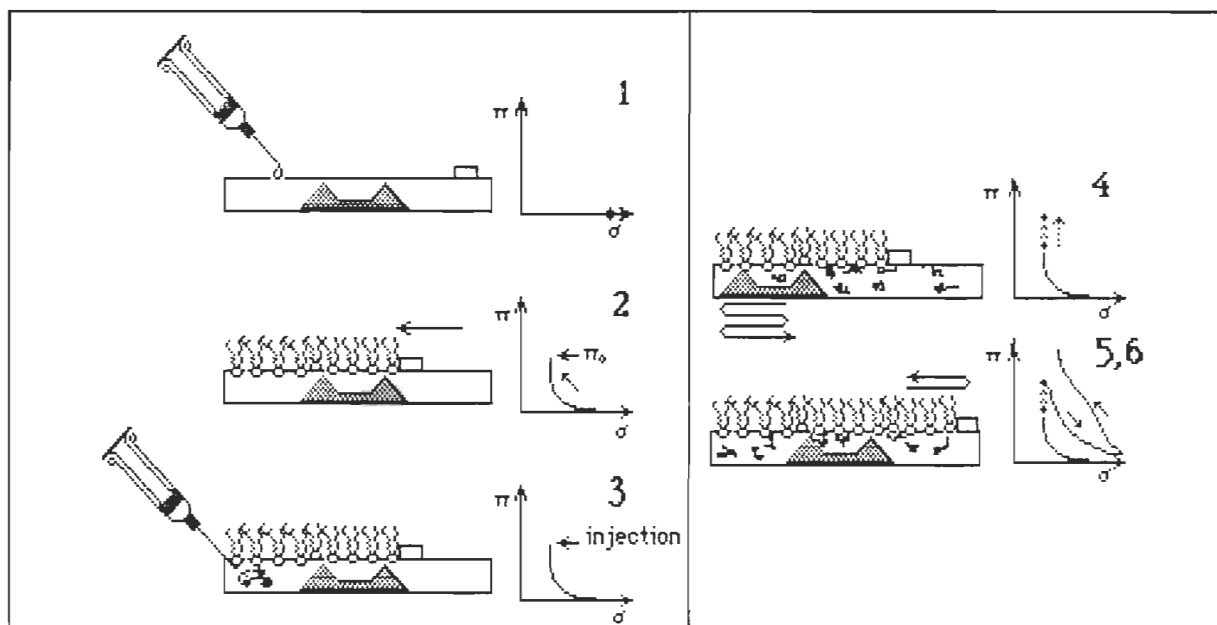


Figure 12. Représentation schématique de la procédure expérimentale utilisée afin de préparer les films mixtes lipide-protéine ou chlorophylle-protéine et de la correspondance avec l'isotherme pression(Π)-aire(σ). La correspondance est la même pour les isothermes de potentiel de surface(ΔV)- σ , de radioactivité de surface(Γ)- σ et d'ellipsométrie de surface($\delta\Delta$)- σ .

pondance est la même pour les isothermes de potentiel et d'ellipsométrie de surface. Suite au nettoyage de la surface aqueuse, la solution de lipide ou de chlorophylle a est déposée goutte-à-goutte (1). Après une attente de 15 minutes permettant au solvant de déposition de s'évaporer, la monocouche est comprimée à une pression Π_0 (2). A ce point, la compression est stoppée et la quantité requise de protéine est injectée dans la sous-phase afin d'obtenir une concentration finale de protéine de $1-2 \times 10^{-7}$ M (3). Cette concentration fut calculée en considérant une répartition homogène de la protéine dans le bain, exception faite du volume du compartiment de référence. Dans le cas des mesures de radioactivité et d'ellipsométrie, un volume équivalent variant entre un et deux mL est prélevé dans le compartiment de référence afin de ramener le niveau d'eau à son état original. Par la suite, le système d'agitation

effectue cinq aller-retour (4). Suite à l'agitation, le film mixte est décomprimé (5) et recomprimé (6) jusqu'au collapse. Dans certains cas, des cycles expansion-compression multiples sont opérés suite à l'injection de la protéine. Ces cycles sont toujours amorcés depuis une pression de référence qui est spécifiée dans le texte.

Nous nous sommes assurés que l'entraînement du prisme, qui traverse la monocouche en son centre, n'a pas d'effet perturbateur sur les propriétés de surface de la chlorophylle a et des lipides utilisés. Cette vérification fut faite en comparant les isothermes Π - σ et ΔV - σ de ces molécules en effectuant toutes les opérations requises pour incorporer les protéines, sauf qu'une quantité équivalente de tampon fut injectée à la place de la solution protéique. Compte-tenu de l'erreur expérimentale, les isothermes obtenues sont identiques. Nous croyons que cette procédure d'incorporation est bien adaptée lorsque des molécules présentant un caractère liquide expansé constituent la monocouche insoluble. Dans le cas de monocouches de type solide, une vérification plus extensive de l'effet de l'agitation demande à être faite.

2.3.8 Mesure des spectres d'absorption et de fluorescence. Dans le cas où les systèmes chlorophylle a -protéine furent étudiés, nous avons mesuré les spectres d'absorption et de fluorescence de la chlorophylle a. Pour ce faire, nous avons déposé ces films sur des lames de quartz selon la technique de Langmuir-Blodgett (Blodgett (1935)). Les lames utilisées furent minutieusement nettoyées dans une solution concentrée d'acide chromosulfurique (Fischer Sci. Co., Montréal, QC) pendant trois jours,

neutralisées dans une solution d'hydroxyde de sodium 0,01N et par la suite rincée cinq fois avec de l'eau filtrée et distillée. La propreté des lames fut vérifiée en s'assurant que le mouillage de la lame par une goutte d'eau est parfait. Dans le cas de la chl a pure et des systèmes chl a-protéine, les dépositions furent menées à une pression constante de 20 mN m^{-1} . Immédiatement après la déposition, les lames furent transférées dans le porte-échantillon d'un spectromètre visible Cary 17D ou Perkin-Elmer 553. Durant toutes ces étapes, nous avons prévenu la photodégradation de la chlorophylle a en travaillant sous éclairage vert tamisé et en plaçant les lames dans des contenants opaques lors du transport.

Dans certains cas, les spectres de fluorescence furent mesurés sur un spectrofluorimètre Spex-Fluorolog II. Les spectres d'excitation et d'émission furent corrigés selon la méthode rapportée par Picard et coll. (1986).

2.4 La mesure de radioactivité de surface

Le but de l'utilisation de la technique de radioactivité est de nous permettre de mesurer directement la concentration interfaciale d'une molécule pouvant former une monocouche ou bien d'une protéine pouvant se répartir entre la sous-phase et l'interface. Quoique le principe de fonctionnement d'un détecteur à gaz soit relativement simple, un certain nombre de paramètres expérimentaux demandent à être établis ou contrôlés. Dans un second temps, il est nécessaire de calibrer le système.

2.4.1 Généralités relatives à la technique. Nous avons précédemment présenté les raisons justifiant l'utilisation d'un détecteur à gaz pour la mesure de la radioactivité de surface. Un détecteur cylindrique à débit de gaz (Baird Nuclears) de 5,1 cm de diamètre est utilisé pour mesurer la radioactivité de surface. Une représentation synoptique du montage expérimental est donnée à la Fig. 13. Le tube est alimenté avec du gaz P-5 (95% argon, 5% méthane, Matheson Canada) fourni à un débit régularisé de $91,7 \pm 7,0 \text{ mL min}^{-1}$. L'influence du débit de gaz sur la sensibilité de détection sera abordé à la section 2.4.4. Une haute tension stabilisée, fournie par l'amplificateur, est appliquée aux bornes du détecteur. Les impulsions produites par les ionisations sont acheminées à un amplificateur (The Nucleus Inc., modèle 5020, Oak Ridge, TN) après passage par un préamplificateur (ORTEC 142PC, EG&G ORTEC Instruments, Markham, ON). L'alimentation du préamplificateur

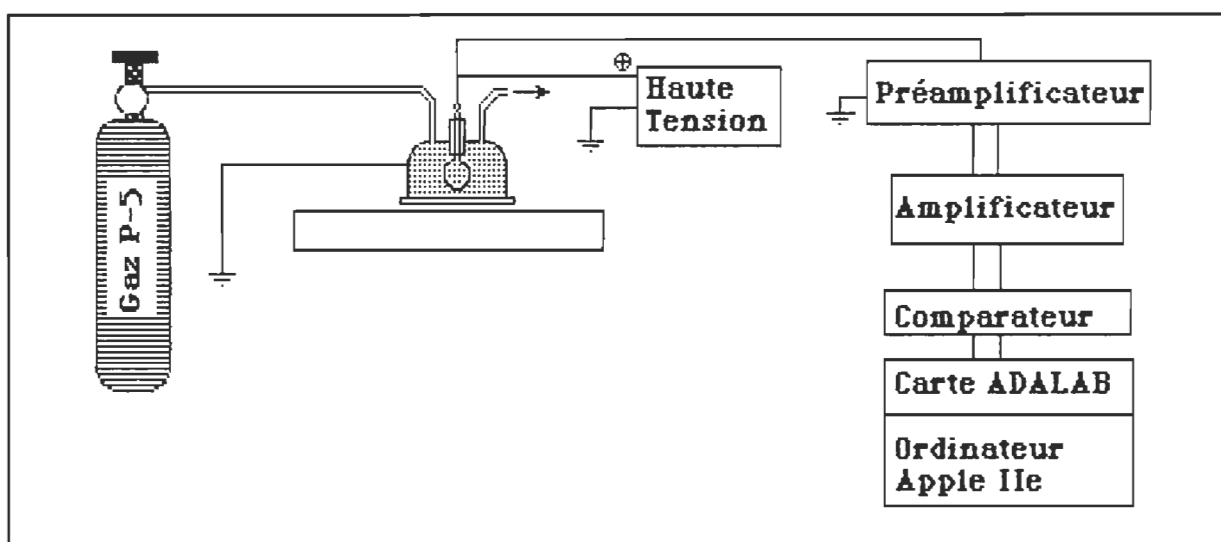


Figure 13. Représentation synoptique du montage utilisé afin de mesurer la radioactivité de surface. Les détails de ce système sont donnés à la Section 2.4.

est également fournie par l'amplificateur. La sortie de l'amplificateur est acheminée à un comparateur dont le seuil de discrimination est variable. La sortie analogue du comparateur est finalement branchée à l'entrée d'une carte d'acquisition Adalab incorporée dans un microordinateur Apple IIe. Un compte maximal de 2^{16} coups peut être mesuré sur une période d'intégration variable.

2.4.2 Effet de la tension sur la sensibilité. La tension appliquée aux bornes du tube affecte grandement son rendement. La Fig. 14 présente la relation existant entre le taux de compte et la tension appliquée aux bornes du tube.

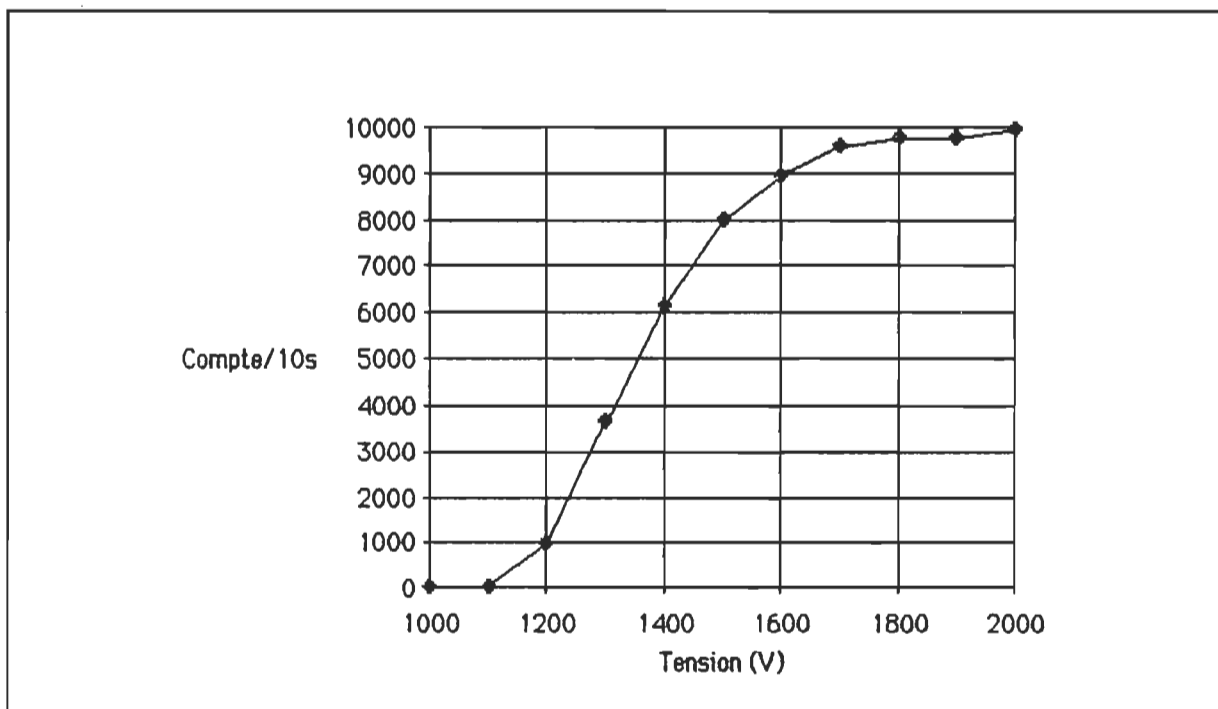


Figure 14. Plateau de comptage établi pour des conditions constantes de distance et de débit de gaz. A 1700 V, le signal varie de 5%/100 V donnant une incertitude de la mesure de $\pm 0,9\%$ pour une source de tension stabilisée à $\pm 0,1\%$. Conditions expérimentales: Disque-source de ^{14}C de $0,163 \mu\text{Ci}$ positionné à 1 cm du détecteur; débit de P-5 de $91,7 \text{ mL min}^{-1}$; discriminateur fixé à 0,14V.

Aux faibles tensions, l'intensité du champ électrique est suffisante afin de séparer un certain nombre d'ions, mais une part importante de ceux-ci ont le temps de se recombinaison avant d'être séparés et collectés. Ce régime est dénommé *régime de chambre d'ionisation*. En augmentant suffisamment la tension, nous arrivons à un point où la séparation des charges est très efficace. En plus, une fois séparés, les électrons migrant vers l'anode gagnent suffisamment d'énergie cinétique afin de produire à leur tour de nouvelles ionisations. Cette région présentera une augmentation linéaire de la sensibilité du détecteur avec une augmentation de la tension, d'où son appellation de zone de *régime proportionnel*. Le *régime Geiger-Mueller* est effectif aux très hautes tensions et présente une invariance de la sensibilité lorsque la tension est accrue. Aux très hautes-tensions (supérieures à 2100 V), des artefacts causés par un chevauchement et une déformation des impulsions furent notés.

Il est clair que notre système de détection doit posséder la meilleure sensibilité que possible. De plus, nous avons avantage à travailler à une tension où la sensibilité du détecteur sera peu affectée par des fluctuations de tension. Cependant, la tension ne doit pas être trop élevée afin d'éviter les problèmes de non-linéarité dus au chevauchement et à la déformation des impulsions. Pour ces raisons, nous avons choisi d'opérer le tube à la limite du régime proportionnel, à une tension de 1700 V. A cette tension, l'incertitude de la calibration causée par les variations de tension est de $\pm 0,9\%$.

2.4.3 Effet de la distance sur la sensibilité. Il est aisé de concevoir que plus le détecteur sera éloigné de la surface, plus le taux de compte mesuré

sera faible. Ce comportement est la conséquence directe de l'atténuation du rayonnement dans le milieu séparant la source radioactive et le détecteur. La Fig. 15 présente la relation existant entre la sensibilité de la chaîne de comptage et la distance séparant une monocouche de $[1-^{14}\text{C}]$ acide octadécanoïque et la fenêtre du détecteur. A une distance de 2 mm, il y a une variation de 5,8% du signal mesuré par mm de déplacement. De cette figure, il ressort deux conclusions importantes: 1) Afin d'avoir une sensibilité maximale, il est préférable de positionner le détecteur le plus près possible de la monocouche et 2) plus la distance émetteur-détecteur est faible, plus la cali-

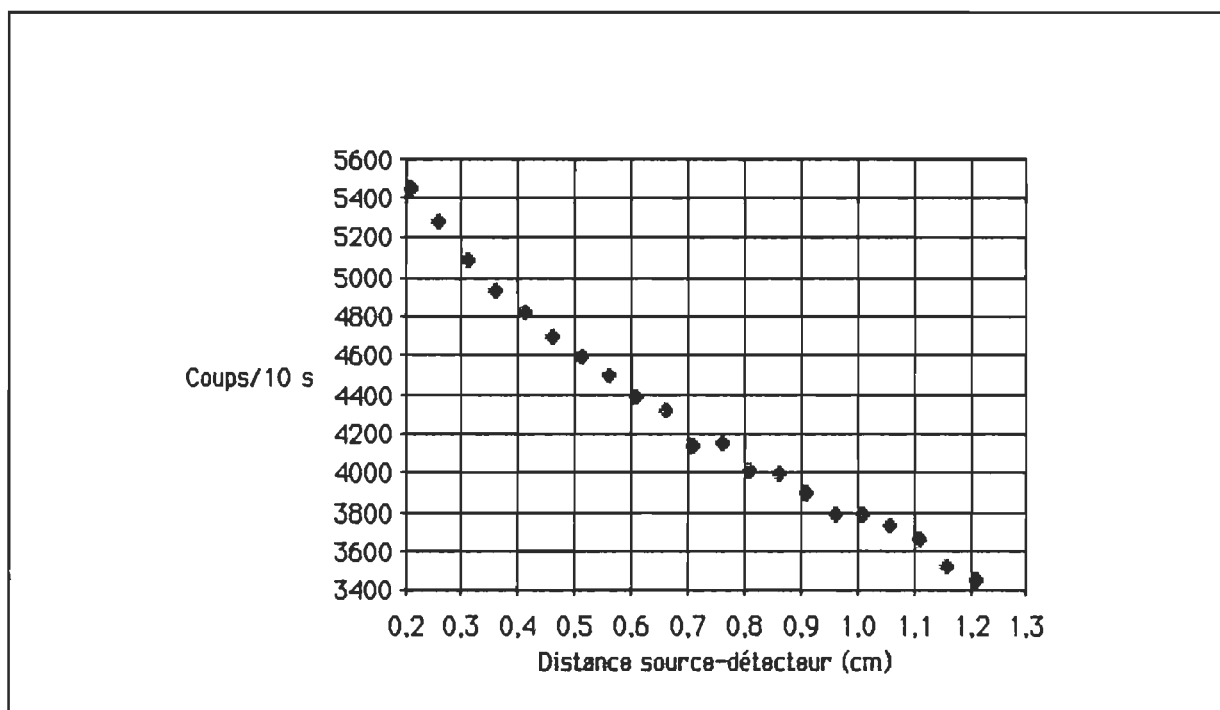


Figure 15. Effet de la distance source-détecteur sur le compte de radioactivité. A une distance de 0,2 cm, la variation du signal est de 5,8 %/mm. Si la distance entre le détecteur et la source peut être ajustée avec une précision de $\pm 200\mu\text{m}$, la calibration est précise à $\pm 1,2\%$. Conditions expérimentales: Source constituée d'une monocouche de $[1-^{14}\text{C}]$ acide octadécanoïque comprimée à 20 mN m^{-1} ; tension appliquée aux bornes du détecteur de 1700 V; discriminateur fixé à 0,14 V et débit de gaz de $91,7\text{ mLmin}^{-1}$.

bration du détecteur est affectée par des variations de distance. Ces observations impliquent qu'afin de pouvoir calibrer le détecteur précisément, il est de première importance de pouvoir le positionner précisément.

2.4.3.1 Mise au point d'un système de positionnement micrométrique. Les systèmes pouvant être utilisés afin de positionner précisément le détecteur de radioactivité par rapport à l'interface sont divers. Dans notre cas, afin de pouvoir reproduire la calibration à une précision de $\pm 1\%$, il est nécessaire d'avoir une reproductibilité de $\pm 200 \mu\text{m}$ sur le positionnement du détecteur. Après l'essai de divers systèmes, nous avons opté pour un système simple représenté à la Fig.16. Ce système repose sur le principe simple du mouillage d'une fine aiguille métallique trempée dans la sous-phase suite au nettoyage de la surface. Après un positionnement micrométrique du détecteur par rapport au bain, le niveau de l'eau est graduellement abaissé en ouvrant un siphon permettant une réduction du niveau de $80 \mu\text{m min}^{-1}$. Lorsqu'il y a détachement du ménisque liant l'aiguille et la sous-phase, le transvasement de la sous-phase est immédiatement stoppé. Le niveau de l'eau ainsi ajusté est précis à $\pm 150 \mu\text{m}$. Afin de déterminer avec une plus grande précision le point de détachement du ménisque, l'aiguille et l'électrode de référence servant à la mesure du potentiel de surface sont reliés à un détecteur de rupture contrôlant un voyant lumineux. Dans les conditions d'opération utilisées, l'incertitude de la calibration associée au positionnement du tube est de $\pm 1,2\%$.

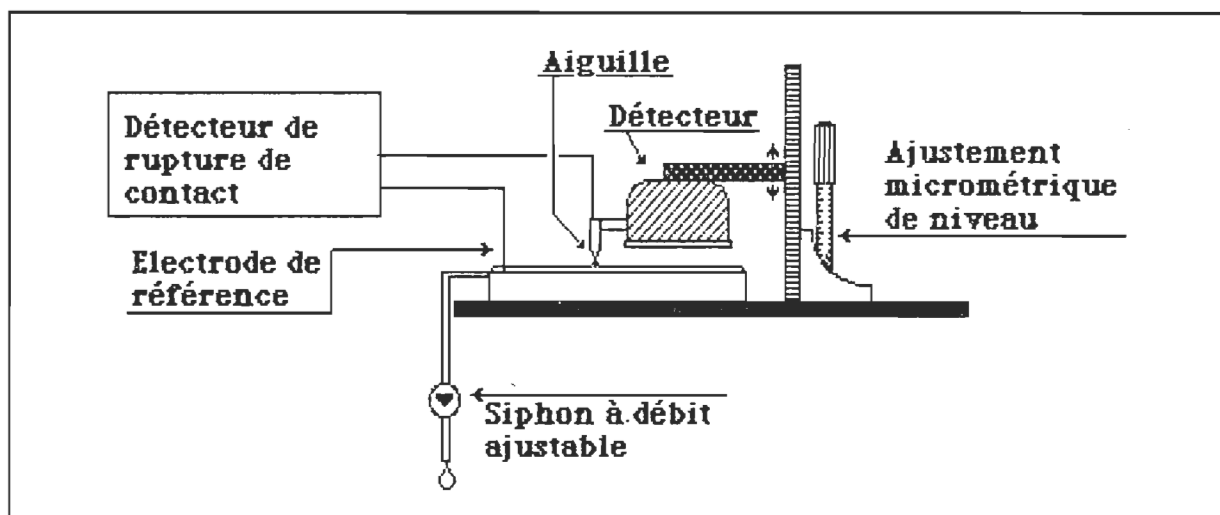


Figure 16. Représentation synoptique du système micrométrique de positionnement du détecteur de radioactivité à la surface du bassin. La procédure utilisée est décrite dans le texte.

2.4.4 Effet du débit de gaz sur la sensibilité. Nous devons nous assurer que le débit de gaz circulant dans le détecteur n'affecte pas de façon significative la calibration de notre détecteur. Nous avons donc entrepris de vérifier l'effet du débit de gaz, régularisé à l'aide d'un débitmètre (Cole-Parmer Instr. Co.). La Fig. 17 représente le taux de compte mesuré dans des conditions fixes d'opération du détecteur lorsque le débit de gaz varie de 36 à 156 mL min⁻¹. Comme nous avons opéré le tube avec un débit de P-5 de 91,7 ± 7,0 mL min⁻¹, l'incertitude relative aux fluctuations de débit de gaz est de ± 0,6%.

2.4.5 Influence de la fenêtre sur la sensibilité. Nous avons déjà discuté de l'effet absorbant de la matière présente sur le parcours séparant l'émetteur radioactif et le détecteur. Outre la couche d'air présente entre la monocouche et le détecteur, le rayonnement β⁻ doit également traverser la fenêtre présente à l'entrée du tube. L'épaisseur massique de cette fenêtre est de première importance puisque plus la quantité de matière rencontrée lors de la traversée

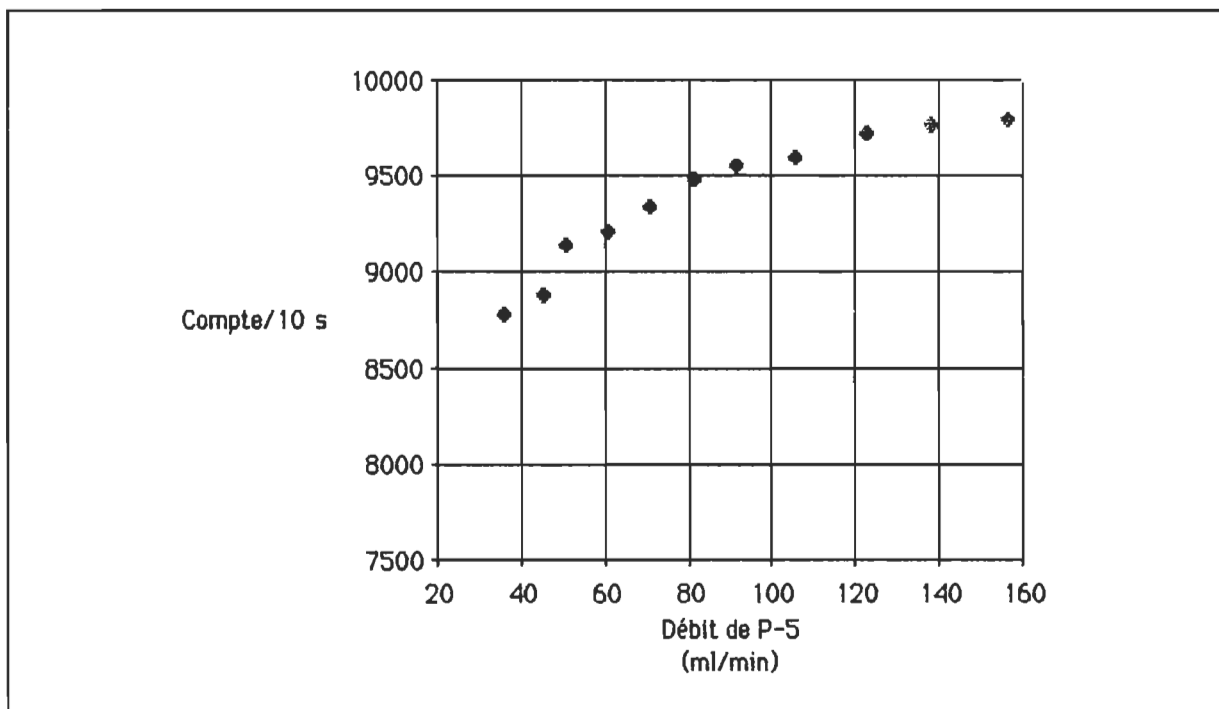


Figure 17. Effet du débit de gaz (P-5) sur la sensibilité du détecteur de radioactivité. Avec un débit régularisé à $91,7 \pm 7,0 \text{ mLmin}^{-1}$, la variation de la mesure expérimentale est de $\pm 1,2\%$. Conditions expérimentales: Disque-source de ^{14}C de $0,163 \mu\text{Ci}$ distant de 1 cm du détecteur; tension appliquée sur le détecteur de 1700 V et discriminateur fixé à 0,14V.

de la fenêtre est grande, plus le rayonnement est atténué. Les fenêtres commercialement disponibles ont, au minimum, une épaisseur massique de $800 \mu\text{g cm}^{-2}$. Nous avons fabriqué nos propre fenêtres en évaporant, à l'aide d'un système d'évaporation à vide, une mince couche d'argent de chaque coté d'une feuille de Mylar (épaisseur de $2 \mu\text{m}$, Dupont Canada, Mississauga, ON) qui possède une épaisseur massique de $272 \mu\text{g cm}^{-2}$. Après déposition des deux couches d'argent, l'épaisseur massique du film était de $296 \mu\text{g cm}^{-2}$. L'épaisseur massique de la fenêtre utilisée tout au long de cette étude était donc trois fois inférieure à celles mesurées pour les fenêtres obtenues commercialement. Le rendement de notre système de détection est accru de près de 5% par l'utilisation des fenêtres fabriquées par évaporation.

2.4.6 Conditions optimales d'opération du compteur à radioactivité. Dans l'étude des systèmes lipide-protéine et chlorophylle *a*-protéine à l'aide de la radioactivité de surface, nous sommes limités par deux facteurs: la faible concentration de protéine adsorbée à l'interface et la faible activité spécifique du produit marqué. Il est ainsi nécessaire, afin d'avoir des mesures précises, d'opérer le tube dans les conditions où le rendement de détection est maximal. Une récapitulation des résultats présentés aux sections 2.4.2 à 2.4.5 est donnée dans le Tableau 3. Considérant l'incertitude associée à ces conditions, la concentration interfaciale déterminée par radioactivité de surface est précise à $\pm 2,7 \%$.

Tableau 3

Récapitulation des conditions optimales d'opération du système de radioactivité de surface pour les systèmes PC(18:1)-cyt c et chl a-cyt c. Dans ces conditions, l'efficacité de détection du système est de $21,0 \pm 0,6\%$.

Tension d'opération	$1700 \pm 17 \text{ V}$
Distance source-détecteur	$300 \pm 20 \text{ }\mu\text{m}$
Débit de gaz	$91,7 \pm 0,7 \text{ mL min}^{-1}$
Fenêtres Mylar-Ag	$296 \text{ }\mu\text{g cm}^{-2}$
Discriminateur ajusté à $0,14 \text{ V}$	

CHAPITRE 3

LES FILMS MONOMOLECULAIRES DE CYTOCHROME C

L'idée traditionnelle du film monomoléculaire composé de molécules qui forment un milieu distinct de la sous-phase s'applique plus difficilement aux monocouches protéiques. Les protéines sont de véritables géants moléculaires comportant des degrés de structuration divers. De plus, la liberté de rotation que possèdent les unités peptidiques les unes par rapport aux autres rend pratiquement impossible la détermination exacte de leur structure sur une base purement énergétique. L'élucidation, au cours des trente dernières années, des structures primaires, secondaires et tertiaires de diverses protéines solubles, a permis l'élaboration de modèles ayant pour but ultime de prévoir l'arrangement spatial des polypeptides à partir de la simple connaissance de la séquence d'acides aminés. La méthode de Chou-Fasman (1978) est sans conteste la méthode de prédiction de structure la plus connue et utilisée. Alors que les structures secondaires et tertiaires des protéines membranaires furent élucidées, il fut constaté que l'applicabilité des modèles statistiques découlés pour les protéines solubles se limite à celles-ci. De nouvelles méthodes de prédiction de la structure des protéines membranaires ont alors été élaborées. Mais quel parallèle y a-t-il entre la spécificité des méthodes de prédiction de la conformation et l'organisation des films monomoléculaires de protéine?

L'organisation d'une protéine dépend essentiellement de la nature de ses constituants, mais aussi de son interaction avec le milieu. Le fait que la solubilité d'une protéine est grandement influencée par la nature du solvant en est un exemple concret. L'interface air-eau présente aux chaînes polypeptidiques deux milieux permettant des interactions spécifiques. Le milieu aqueux permet de combler, tout comme il le fait pour la forme solubilisée de la protéine, les ponts hydrogènes prenant place entre les résidus polaires extérieurs et l'eau. Il est généralement admis que les résidus hydrophobes, ou les segments d'hydrophobicité importante, se partagent dans la phase aérienne alors que les résidus polaires demeurent dans la phase aqueuse de l'interface (Bull (1947); Cumper et Alexander (1950); MacRitchie (1981); Ter-Minassian-Saraga (1981)). Le bilan énergétique de l'organisation des protéines à l'interface air-eau présente donc une analogie intéressante avec celui de l'insertion d'une protéine dans une membrane lipidique; un partage des caractères polaires et apolaires de la protéine s'effectue entre deux milieux de polarité opposée.

Les différences et les analogies entre la structure d'une protéine native en solution et adsorbée à l'interface air-eau sont présentées à la Fig. 18. Il est possible de changer le partitionnement d'un film de protéine en diminuant l'état de compacité. La compression d'un film entraîne une augmentation de l'énergie libre de surface. Afin d'atteindre son état d'énergie minimale, le partitionnement des résidus polaires et hydrophobes sera rééquilibré afin que le changement d'énergie résultant de l'augmentation de l'énergie libre de

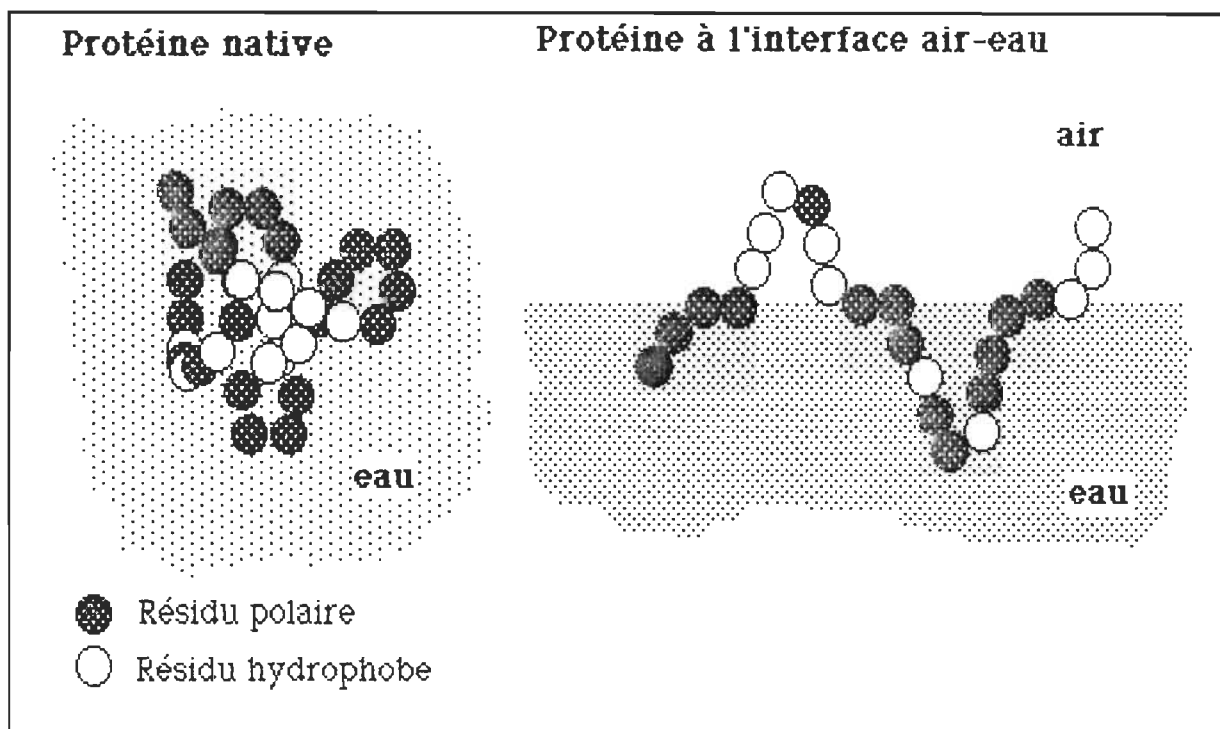


Figure 18. Représentation schématique de la distribution des résidus polaires et hydrophobes d'une protéine dans sa configuration native et étalée à l'interface air-eau.

surface et du repartage des résidus protéiques soit minimal. La balance énergétique d'un tel processus fut présentée par MacRitchie (1977). Le modèle proposé par cet auteur prévoit que la proportion des résidus présents à l'interface, donné comme le rapport du nombre de résidus présents à l'interface (n_i), et du nombre de résidus présents dans la sous-phase (n_b) est donné par:

$$\frac{n_i}{n_b} = e^{(\Delta G_0 - \Pi \Delta A)} \quad (3.1)$$

alors que ΔG_0 est l'énergie libre d'adsorption par résidu à $\Pi=0 \text{ mN m}^{-1}$; Π est la pression de surface à laquelle est comprimé le film et ΔA est la section moyenne par résidu. Considérant ΔG_0 et ΔA constants, l'équation 3.1 prévoit

qu'en accroissant la pression de surface appliquée sur un film protéique, le système relaxera vers son état d'énergie minimale en changeant le rapport des résidus distribués entre l'air et la sous-phase. Cette équation prévoit que la proportion de résidus présents à l'interface décroît alors que la pression augmente. Un des cas limites de cette équation concerne le point où le travail de compression, $\Pi \Delta A$ équivaut à l'énergie libre d'adsorption. A ce point, la répartition des résidus entre les portions polaires et apolaires de l'interface est égale; n_i/n_b vaut l'unité. Malgré la représentation qu'il donne des mécanismes d'adsorption et de désorption des protéines aux interfaces, ce formalisme ne donne aucune indication relative à la spécificité du processus. Ce mécanisme est-il coopératif ou non? S'il n'y a pas de coopérativité, quels résidus quittent préférentiellement l'interface lorsque Π est accru? Ces questions d'intérêt sont abordées dans les sections suivantes.

3.1 L'isotherme de pression de surface-aire moléculaire du cytochrome c.

Il est possible, dans certaines conditions particulières d'étalement, d'obtenir un film monomoléculaire de protéine à l'interface air-eau. Par comparaison aux films d'acides gras ou de phospholipides, les films protéiques présentent un niveau de complexité supérieur, conséquence directe de la structure complexe et d'une connaissance incomplète des forces qui régissent l'organisation de cette classe de molécules. Nous sommes parvenus, en utilisant diverses méthodes d'étalement, qui sont présentées à la Section 2.3.2, à obtenir des films de cytochrome c. Une isotherme Π - σ obtenue pour une compression continue du film est présentée à la Fig. 19. Parce nous n'avons aucune

assurance que la totalité du matériel étalé est demeuré à l'interface, suite à la déposition, l'échelle d'aire moléculaire est graduée en unités arbitraires. Ce point fera l'objet d'une discussion subséquente.

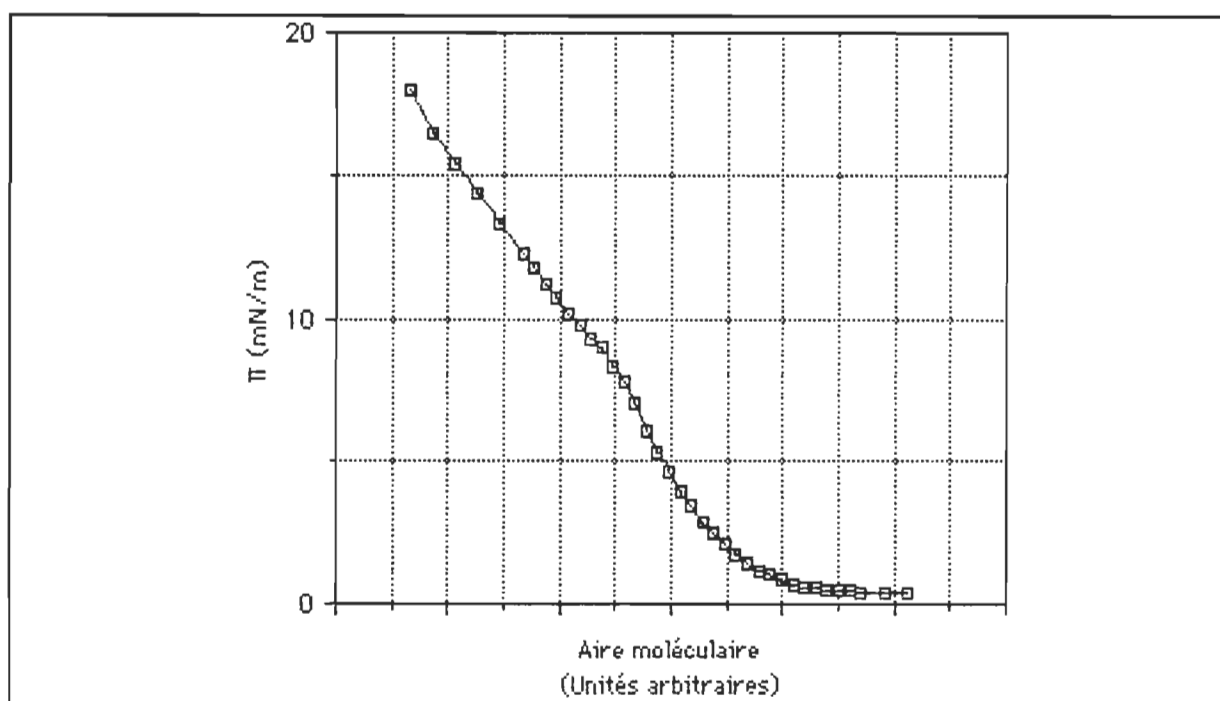


Figure 19. Isotherme de pression de surface (Π) en fonction de l'aire moléculaire du cytochrome c étalé à l'interface air-eau (tampon Tris 10^{-3} M, pH=8,0) par déposition de cristaux. Pour des raisons citées dans le texte, l'échelle d'aire moléculaire est graduée en unités arbitraires. L'isotherme fut obtenue par compression continue à une température de 20°C.

L'isotherme Π - σ présentée à la Fig.19 possède la traditionnelle forme sigmoïde rapportée pour de nombreuses protéines solubles (Bull (1947); Cheesman et Davies (1954); Graham et Phillips (1979b); MacRitchie et Ter-Minassian-Saraga (1984); Herrington et Sahi (1987)). La courbe présente deux zones distinctes délimitées par la pression de 8 mN m⁻¹. De 0 à 8 mN m⁻¹, la courbe présente une croissance continue de compressibilité et, au-delà de 8 mN m⁻¹, ($d\Pi/dA$) est constant jusqu'au maximum de pression mesurée, soit 18 mN

m^{-1} . Il est très intéressant de noter que la portion linéaire de la courbe peut s'extrapoler, à aire moléculaire nulle, à une valeur limite de $\Pi=23 \text{ mN m}^{-1}$. Cette constatation est en accord avec le fait qu'indépendamment de la quantité de protéine initialement déposée à l'interface, il nous est impossible de comprimer le film à des pressions de surface supérieures à 20 mN m^{-1} car, aux valeurs maximales de Π , la barrière mobile entre en contact avec le flotteur. Ces observations mettent en évidence que la portion de l'isotherme de pression de surface mesurée pour des valeurs supérieures à $\Pi=8 \text{ mN m}^{-1}$ représente la solubilisation graduelle de la protéine dans la sous-phase.

Afin de minimiser les pertes de matériel dans la sous-phase, il est courant de caractériser les isothermes de pression de surface des protéines en ajoutant de fortes concentrations de sulfate d'ammonium dans la sous-phase ou en travaillant à un pH voisin du point isoélectrique de la protéine. La concentration de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ peut varier de 5 à 35 % (p/v) (Trurnit (1960); Davies et coll. (1983)). L'ajustement de ces deux paramètres vise à minimiser la solubilité de la protéine dans la sous-phase. Dans notre cas, nous désirons caractériser le comportement interfacial du cytochrome c afin de pouvoir, lors de l'étude des systèmes lipide-protéine, discerner entre la simple adsorption de la protéine à l'interface et son interaction avec la monocouche lipidique. Pour ce faire, le comportement interfacial de la protéine fut caractérisé dans les mêmes conditions utilisées lors de l'étude des systèmes mixtes.

3.2 Influence de la méthode de déposition sur les isothermes de pression de surface des films de cytochrome c. Trois méthodes furent utilisées afin de former des monocouches de cytochrome c: la déposition solide, l'étalement à partir d'une solution éthanol:eau (2:1, v:v) et la simple adsorption depuis la sous-phase. Parmi ces trois méthodes, l'étalement à partir d'une solution éthanol:H₂O (2:1, v:v) est celle qui donne les résultats les plus reproductibles et les aires moléculaires les plus élevées. Ce résultat suggère que cette méthode permet la déposition la plus constante et minimise les pertes de matériel dans la sous-phase. La Figure 20 présente l'isotherme Π - σ obtenue pour le cytochrome c étalé par cette méthode. Les aires moléculaires, estimées par densimétrie, furent calculées en considérant que tout le matériel est demeuré présent à l'interface suite à la déposition.

Cette figure présente également les isothermes Π - σ obtenues lorsque le film est étalé par déposition de cristaux et par simple adsorption. La déposition par cristaux donne des aires moléculaires beaucoup plus faibles et les isothermes ne sont pas reproductibles. Ce comportement est causé par l'entraînement plus important de matériel dans la sous-phase lorsque le film est fabriqué de cette façon. Nous avons quantitativement évalué qu'en moyenne, six fois moins de matériel demeure à l'interface lorsque la déposition est solide, et non pas effectuée à partir d'une solution éthanol:eau.

Il est aisé de comprendre le problème inhérent à la détermination de la concentration interfaciale d'un film formé par adsorption à l'interface air-eau de la protéine native solubilisée dans la sous-phase. L'adsorption est un

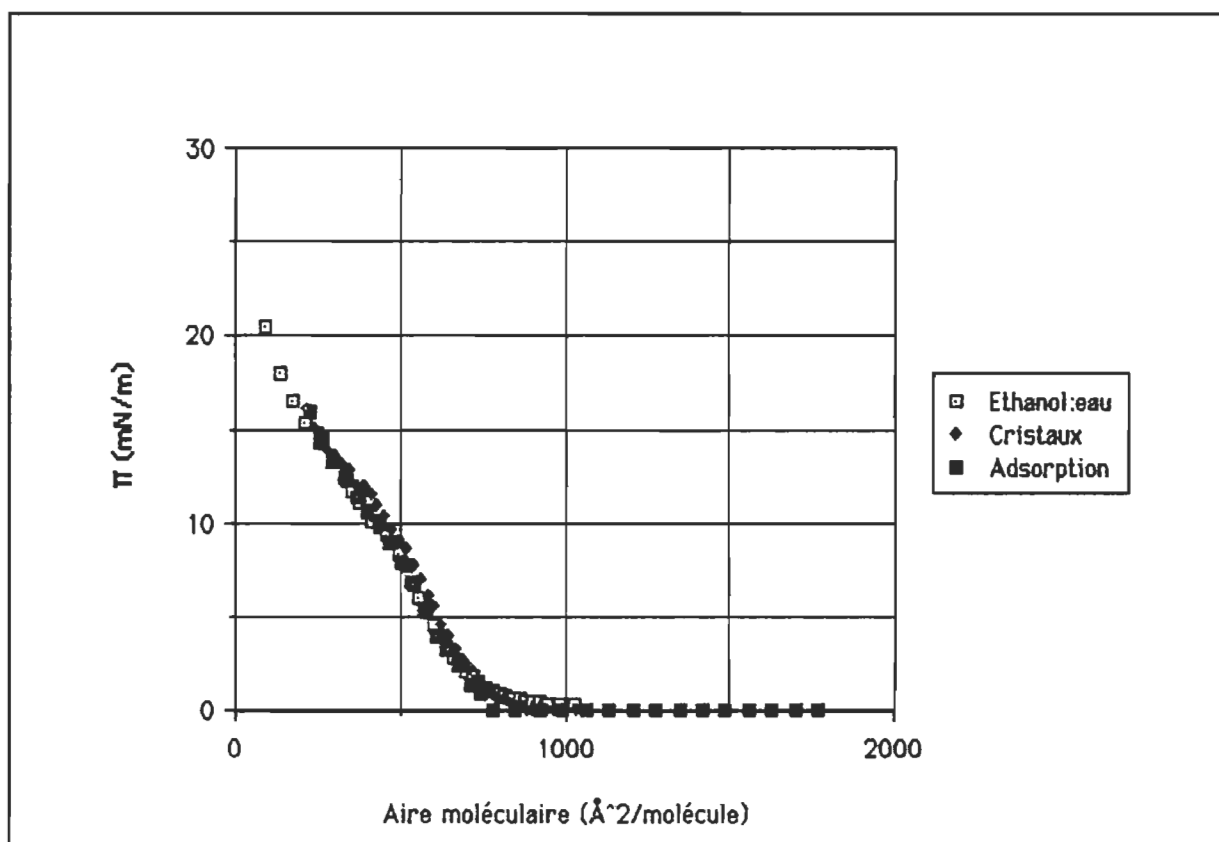


Figure 20. Comparaison des isothermes de pression de surface (Π) en fonction de l'aire moléculaire (σ) du cytochrome c étalé à l'interface air-eau (tampon Tris 10^{-3} M, pH-8,0) par diverses méthodes. L'isotherme Π - σ du cytochrome c étalé à partir d'une solution éthanol:eau (2:1, v:v) est la moyenne de dix mesures et est reproductible à $\pm 7\%$. La figure présente également les isothermes Π - σ obtenues pour le cytochrome c déposé à partir de cristaux et adsorbé à l'interface. Pour des fins de comparaison, les aires moléculaires des films obtenus par déposition solide et adsorption ont été normalisées aux valeurs du film étalé avec le solvant.

processus dynamique qui se produit selon une cinétique régie par la différence d'énergie existant entre les formes solubilisée et étalées. Ainsi, à moins d'être au voisinage de l'état d'équilibre, l'isotherme de pression de surface sera altérée au cours du temps par l'adsorption continue de protéine. Nous avons évalué qu'après une période d'adsorption de 30 minutes, seulement 1% du matériel initialement injecté dans la sous-phase constitue le film.

Des trois méthodes de formation d'une monocouche protéique utilisées, seule la déposition depuis une solution éthanolique permet la formation efficace et reproductible d'un film. Dans le cas de la déposition solide et de l'adsorption, les pertes sont importantes. Il est probable que la perte partielle de la structure adoptée par la protéine solubilisée dans la solution éthanolique soit responsable de la plus grande efficacité de déposition. Dans la solution de polarité réduite, la structure du cytochrome c est plus relâchée car le milieu externe présente une plus grande affinité pour les résidus non-polaires. Cette prédénaturation abaisse la barrière d'énergie devant être franchie lors de l'adsorption et permet de façon plus efficace l'étalement des molécules à l'interface. Quoique le rendement d'étalement ne soit pas le même pour les trois méthodes d'étalement, les propriétés mécaniques des films formés sont identiques. Pour des fins de comparaison, les isothermes Π - σ obtenues pour la déposition solide et l'adsorption furent normalisées avec celles obtenues par déposition à partir de la solution éthanol:eau. Comme il est possible de le constater à la Figure 20, la forme des isothermes est identique.

3.3 Influence de la méthode de déposition sur les isothermes de potentiel de surface et d'ellipsométrie des films de cytochrome c. Nous venons de montrer que la méthode de formation du film monomoléculaire de cytochrome n'influence que la proportion de la protéine initialement déposée qui demeure à l'interface. Présentés sur une échelle commune, les isothermes Π - σ sont

identiques. En est-il de même des mesures de potentiel de surface et d'ellipsométrie?

La moyenne des isothermes de potentiel de surface obtenus pour des films de cytochrome c étalés à partir d'une solution éthanolique, de cristaux ou simplement adsorbé depuis la solution sont présentés à la Figure 21. Considérant que la reproductibilité des isothermes de potentiels de surface de substances qui sont stables à l'interface air-eau (phospholipides, acides gras) est de ± 15 mV, nous pouvons conclure que les isothermes obtenues par les trois méthodes de préparation des films de cyt c sont identiques. Dans les trois

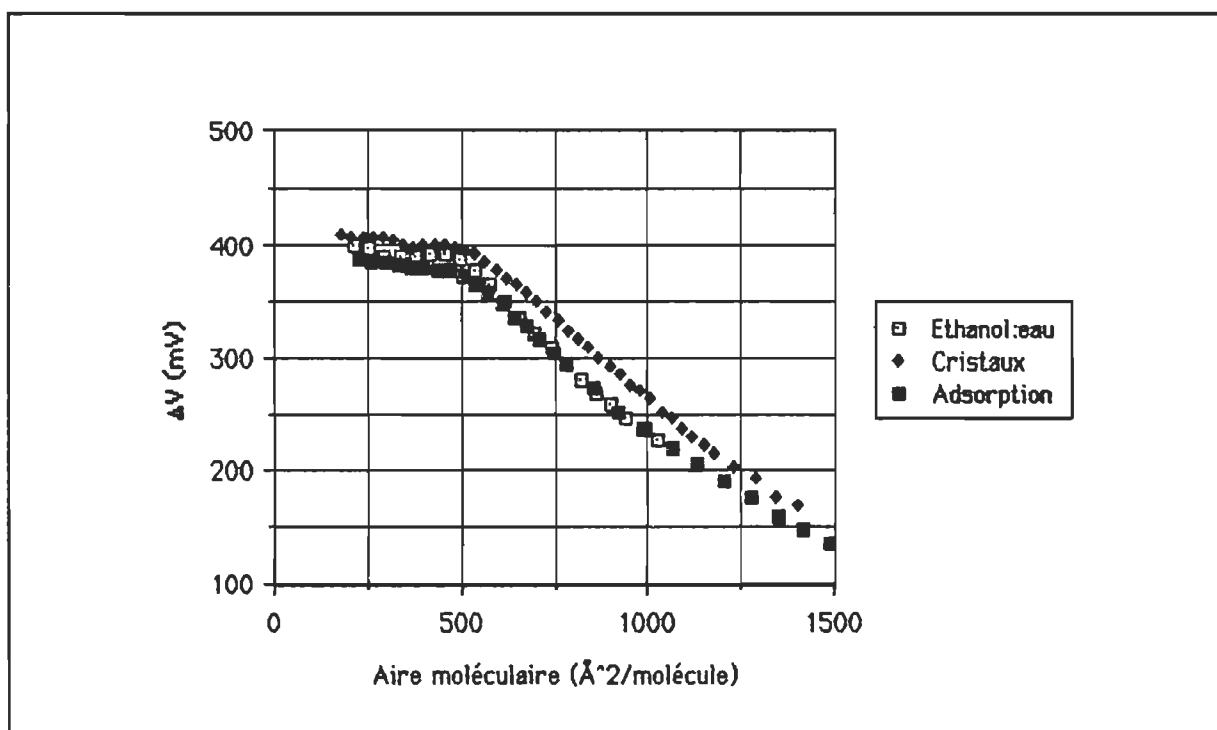


Figure 21. Comparaison des isothermes de potentiel de surface (ΔV) en fonction de l'aire moléculaire (σ) du cytochrome c étalé à l'interface air-eau (tampon Tris 10^{-3} M, pH=8,0) à partir d'une solution éthanol:eau (2:1, v:v), de cristaux ou adsorbée depuis la solution. L'incertitude sur la valeur de ΔV est de ± 15 mV.

cas, une augmentation régulière de ΔV donne place à un plafonnement de la mesure lorsque l'aire moléculaire est réduite à des valeurs inférieures à $500 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$. Il est notable que ce point correspond à l'aire donnant lieu à une inflexion de l'isotherme Π - σ ($\Pi=8 \text{ mN m}^{-1}$). C'est de 500 à $0 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$ qu'une solubilisation graduelle du film se produirait. Est-il possible d'affirmer que l'isotherme de potentiel de surface nous permet de tirer les mêmes conclusions?

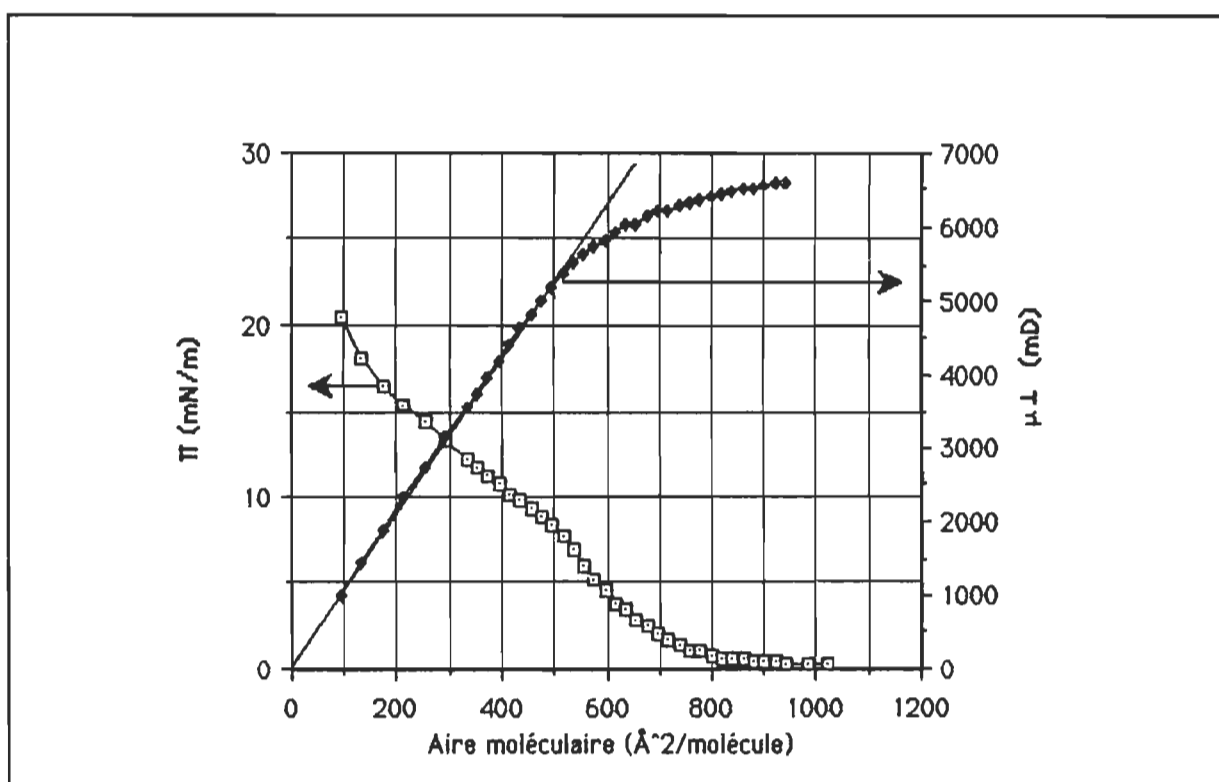


Figure 22. Comparaison des isothermes de pression de surface (Π) en fonction de l'aire moléculaire (σ) et de moment dipolaire perpendiculaire (μ_{\perp})- σ obtenues pour un film de cytochrome c étalé à l'interface air-eau (tampon Tris 10^{-3} M , pH-8,0) depuis une solution éthanol:eau (2:1, v:v). Pour des σ compris entre 0 et $500 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$, μ_{\perp} présente une relation linéaire passant par l'origine.

La mesure de potentiel de surface offre le désavantage d'être une valeur dépendante de la concentration interfaciale. Comme il fut montré à la section 2.3.4, il est plus pratique de transformer cette valeur en son équivalent indépendant de la densité superficielle: le moment dipolaire perpendiculaire, μ_{\perp} . La Figure 22 présente une superposition des isothermes Π - σ et μ_{\perp} - σ obtenus pour le cytochrome c. Comme il fut montré précédemment, sur une échelle commune d'aire moléculaire les isothermes Π - σ , et ΔV - σ sont identiques, indépendamment de la méthode utilisée pour former le film. L'isotherme μ_{\perp} - σ du cytochrome c présente une décroissance non-linéaire de μ_{\perp} pour des σ supérieurs à 500 Å² molécule⁻¹. Pour des aires comprises entre 0 et 500 Å² molécule⁻¹, il existe une relation linéaire entre μ_{\perp} et σ . De plus, cette relation linéaire intercepte l'origine. Ce comportement est en tout point conforme à l'idée d'une désorption du matériel de la portion de l'interface contribuant à la mesure de potentiel électrique.

L'Annexe A présente la simulation et l'interprétation de l'isotherme de déphasage ellipsométrique en fonction de l'aire moléculaire d'un amphiphile fort simple: l'acide octadécanoïque. En consultant cette étude, il est facile d'estimer la complexité du traitement devant être apporté afin de solutionner l'isotherme ellipsométrique d'une macromolécule tel le cytochrome c. Les isothermes ellipsométriques de protéines, mesurées à l'interface air-eau n'abondent pas dans la littérature. Des études menées à l'interface air-eau (Feijter et coll. (1978); Graham et Phillips (1979a); Watanabe et coll. (1986)), il ressort qu'il est nécessaire de mesurer simultanément les deux angles ellipsométriques, $\delta\psi$ et $\delta\Delta$, afin d'établir le nomogramme permettant d'établir

l'épaisseur et la concentration du film (MacCrackin (1969)). Il nous fut impossible de mesurer toute valeur de $\delta\Psi$, probablement à cause de la trop faible épaisseur du film. Conséquemment, l'interprétation de l'isotherme ellipsométrique présentée à la Fig. 23 apparaît virtuellement impossible. Combinant les techniques d'ellipsométrie et de radioactivité de surface, Jönsson et coll. (1985) ont montré qu'il existe une relation linéaire entre $-\delta\Delta$ et la concentration interfaciale de protéine adsorbée sur un substrat solide. Naturellement, cette relation linéaire passe par l'origine. Nous avons vérifié la validité de cette observation en portant en graphique $-\delta\Delta$ en fonction de l'inverse de l'aire moléculaire. Cette relation est présentée à la Figure 24.

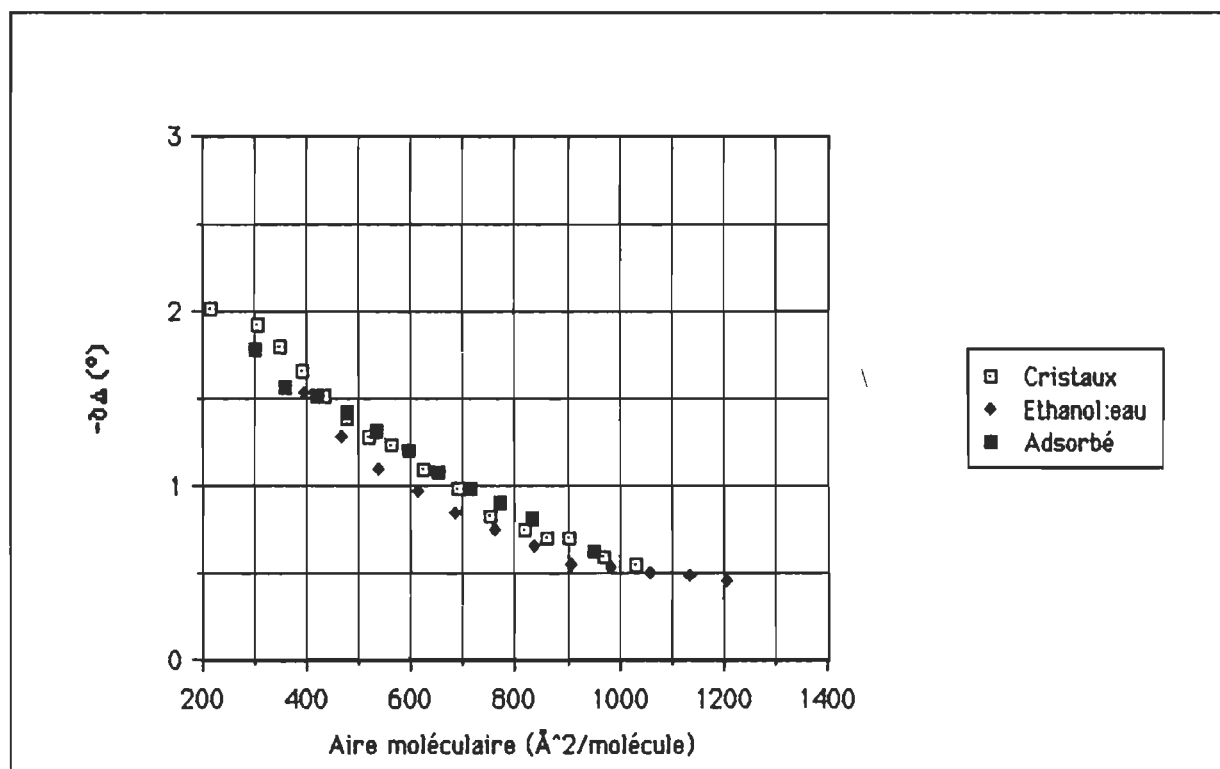


Figure 23. Comparaison des isothermes de déphasage ellipsométrique($-\delta\Delta$)-aire moléculaire (σ) obtenues pour des films de cytochrome c étalés à l'interface air-eau (tampon Tris 10^{-3} M, pH-8,0) depuis une solution éthanol:eau (2:1, v:v), des cristaux ou adsorbée depuis la sous-phase. L'incertitude sur la valeur de $\delta\Delta$ est de $\pm 0,04^\circ$.

La relation existant entre $-\delta\Delta$ et la concentration de surface, exprimée comme l'inverse de l'aire moléculaire, est satisfaisante de 1 à 2×10^{-3} molécule \AA^{-2} . De plus, comme nous devons nous y attendre, cette portion passe par l'origine. En référant aux isothermes Π - σ préalablement présentées, cette zone de linéarité couvre la portion de l'isotherme comprise entre 0 et 8 mN^{-1} . Au-delà d'une densité de 2×10^{-3} molécule \AA^{-2} , le comportement de la courbe dévie de la linéarité. Considérant les aires estimées lors de la déposition du film dans une solution éthanol:eau (2:1, v:v), nous obtenons, pour la portion linéaire de la courbe, une pente de $3,4^\circ \text{ cm}^2 \mu\text{g}^{-1}$ alors que Jönsson et coll. rapportent, pour l'immunoglobuline G, des valeurs variant entre 6 et $10^\circ \text{ cm}^2 \mu\text{g}^{-1}$, dépendamment du substrat utilisé. Considérant que les protéines

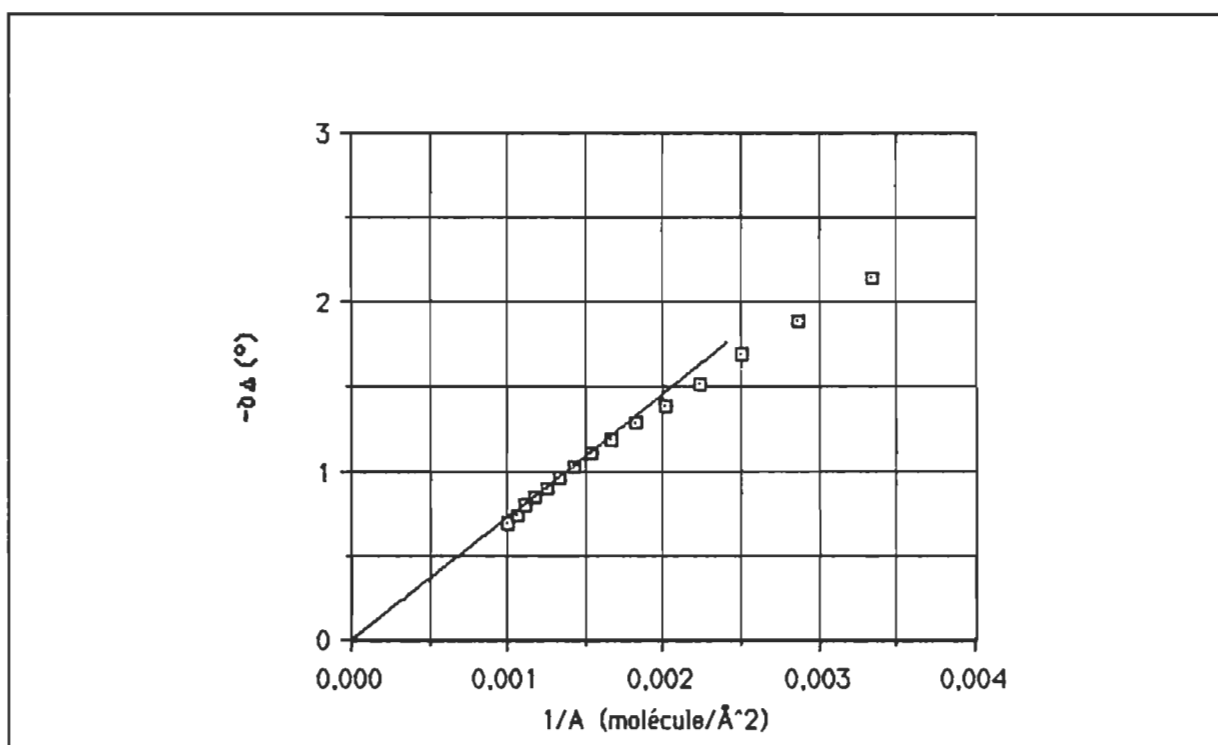


Figure 24. Représentation de la relation existant entre la concentration interfaciale, exprimée comme l'inverse de l'aire moléculaire, et le déphasage ellipsométrique ($-\delta\Delta$) mesuré pour un film de cytochrome c organisé à l'interface air-eau.

étudiées sont différentes et que ces auteurs travaillent sur des substrats solides chimiquement modifiés, nous voyons une certaine correspondance entre leurs résultats et les nôtres. Nous verrons par analyse du comportement interfacial du [^{14}C]cytochrome c que cette différence peut également être expliquée par une sous-estimation de l'aire moléculaire réelle.

Quelle signification physique pouvons nous donner à cette relation linéaire? Le lecteur intéressé trouvera à l'Annexe A une étude détaillée de la signification du déphasage ellipsométrique ($\delta\Delta$) et des informations qu'il est possible de tirer de cette mesure pour une molécule simple, nommément l'acide octadécanoïque. Pour ce type de molécule, afin d'expliquer l'isotherme ellipsométrique, il est nécessaire de considérer l'anisotropie du film. C'est le haut niveau de structuration d'un tel film à l'interface air-eau qui rend nécessaire la discrimination dimensionnelle des propriétés physiques du film. Dans le cas des films protéiques, la multitude des groupements polaires et non-polaires combinée à la complexité structurale de ceux-ci nous permettent de considérer un comportement isotrope des films protéiques. Alors, $\delta\Delta$ est défini en fonction des indices de réfraction du film, n_F , de son épaisseur, d , et de l'indice de réfraction du substrat, n_2 , par la relation:

$$\delta\Delta = L \frac{d (n_2^2 - n_F^2) (n_F^2 - 1)}{n_F^2} \quad (3.2)$$

où L , une constante dépendante des conditions expérimentales, est donnée par:

$$L = \frac{4 \pi \cos \phi \sin \phi n_2^2}{\lambda (n_2^2 - 1) (\sin^2 \phi - n_2^2 \cos^2 \phi)} \quad (3.3)$$

alors que ϕ est l'angle d'incidence du faisceau lumineux (60°) et λ sa longueur d'onde (6328 Å). Si, en première approximation, nous considérons que l'indice de réfraction n_F demeure inchangé lorsque le film est comprimé, la relation linéaire existant entre $\delta\Delta$ et la concentration interfaciale est une conséquence directe de l'épaississement du film.

Lorsque la densité interfaciale devient supérieure à 0,002 molécule Å⁻², nous observons une déviation de la loi d'additivité. Cette divergence peut trouver source dans une fausse estimation de la densité interfaciale réelle ou dans un changement de l'indice de réfraction du film. Il ne faut pas oublier que la densité de surface présentée à la Fig.24 fut estimée à partir de la réciproque de l'aire moléculaire; cette même aire moléculaire fut calculée en considérant que tout au long de la compression, le matériel demeure à l'interface. Nous avons mentionné que les isothermes Π - σ et ΔV - σ suggèrent qu'il y a solubilisation graduelle du film aux pressions de surface supérieures à 8 mN m⁻¹. Ce phénomène implique qu'au-delà de 8 mN m⁻¹, les densités interfaciales présentées à la Fig. 24 sont surévaluées. Ce comportement corrobore la déviation sous la droite. Le changement de l'indice de réfraction du film soumis à une compression permet également d'expliquer des déviations à la linéarité. La Figure 25 présente les valeurs de $\delta\Delta$ calculées pour diverses valeurs de n_F et de d à l'aide des Eqs. 3.2 et 3.3 en considérant $\phi=60^\circ$, $\lambda=6328$ Å et $n_2=1,332$. S'il se produit un changement de n_F en cours de

compression, nous devons nous attendre à ce que cette valeur croisse car les résidus hydrophobes, qui possèdent de plus hauts indices de réfraction, sont plus fortement ancrés à l'interface. Si ce phénomène est réel, il faut que simultanément à l'augmentation de l'indice de réfraction se produise une diminution de l'épaisseur du film. Ce comportement n'est conciliable qu'avec un mécanisme permettant la solubilisation. Le résultat présenté à la Figure 25 comporte une information importante. Comme nous ne sommes pas en mesure de déterminer l'angle ellipsométrique $\delta\Psi$, il apparaît que l'épaisseur de notre film est inférieure à 200 Å (DeFeijter et coll. (1978)). Nous pouvons constater que les solutions présentées à la Fig. 25 qui présentent des valeurs de $\delta\Delta$ voisine des valeurs rapportées à la Fig. 24 ont des indices de réfraction moyens peu élevés. Considérant que l'indice de réfraction du substrat est de 1,332 et que l'indice de réfraction d'un lipide est d'environ 1,48 (voir Annexe

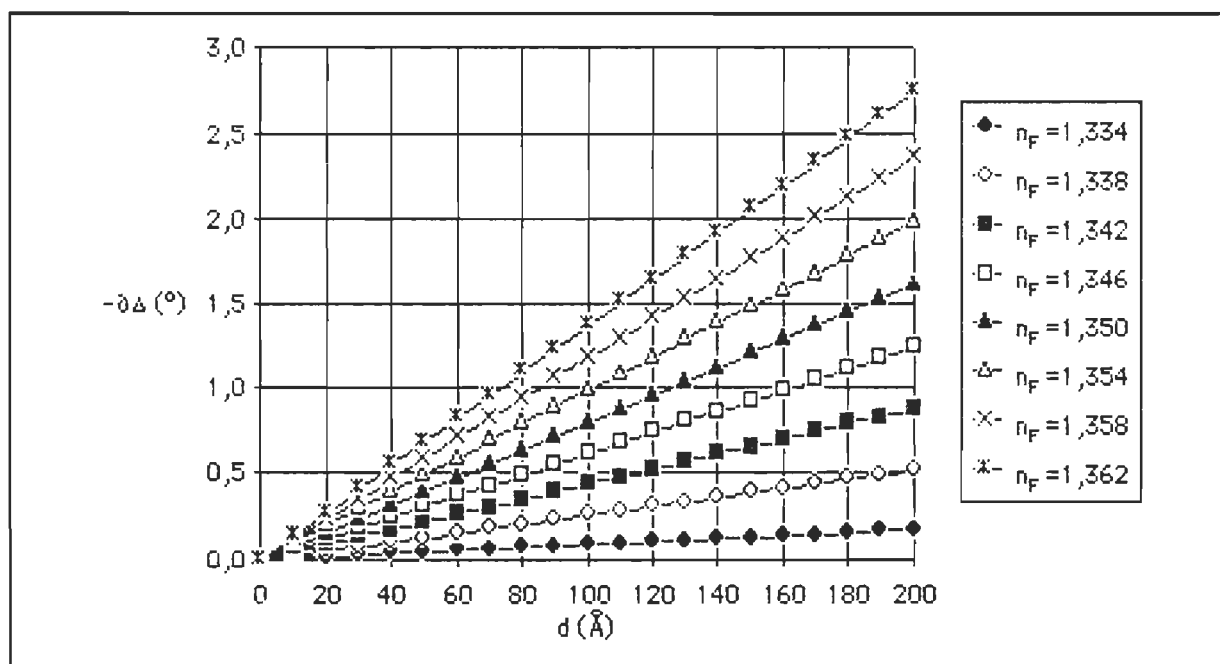


Figure 25. Illustration de la dépendance du déphasage ellipsométrique ($-\delta\Delta$) avec l'épaisseur, d , et l'indice de réfraction, n_F , d'un film isotrope. Ces valeurs furent calculées en conformité avec les équations 3.2 et 3.3 en considérant $\phi=60,0^\circ$, $\lambda=6328$ Å et $n_2=1.332$.

A), nous pouvons conclure que le film de cytochrome c possède un indice de réfraction plus proche de celui de l'eau que de celui d'un lipide.

3.4 Vérification des pressions limites d'adsorption et de désorption du cytochrome c. Nous avons précédemment suggéré qu'au-delà d'une pression de surface de 8 mN m^{-1} , l'isotherme Π - σ mesurée représente la solubilisation progressive du film depuis l'interface vers la sous-phase. Afin de vérifier ce phénomène, nous avons entrepris de mesurer les isothermes de pression de surface d'un film de cytochrome c soumis à une série de cycles compression-expansion ayant comme référence une pression de surface voisine de zéro et des maxima croissants. Pour l'expérience présentée, la pression de référence était de $0,7 \text{ mN m}^{-1}$ alors que les maxima des 17 cycles opérés consécutivement étaient respectivement: 0,9; 1,6; 2,4; 3,5; 4,6; 5,8; 7,4; 8,9; 9,9; 11,0; 12,1; 13,0; 14,1; 15,2; 16,2; 17,3 et $18,1 \text{ mN m}^{-1}$. Ces résultats, présentés sous forme d'isotherme Π -position et ΔV -position, furent regroupés aux Figures 26 à 28 selon trois comportements distincts. Dans la réalité, ces résultats ne font qu'une seule et même expérience. La position de la barrière mobile est directement proportionnelle à l'aire moléculaire occupée par le film.

Pour des maxima compris entre 0,9 et $7,4 \text{ mN m}^{-1}$ (Fig. 26), nous pouvons observer qu'il se produit un décalage des isothermes Π - σ vers des aires moléculaires supérieures. L'observation peut également être faite à partir des isothermes de potentiel de surface. Ce résultat correspond en tout point à une adsorption continue de matériel solubilisé dans la sous-phase. Il est intéressant de constater que la pression de surface où cesse l'adsorption du

matériel ($7,4 \text{ mN m}^{-1}$) est voisine de la pression de 8 mN m^{-1} ; en plus d'être l'endroit où l'isotherme Π - σ présente une inflexion, cette valeur fut identifiée comme la pression de surface d'équilibre du cytochrome c par Krebs et Phillips (1984).

Lorsque la limite supérieure de compression est située entre $8,9$ et $13,0 \text{ mN m}^{-1}$ (Fig. 27), les isothermes de pression et de potentiel de surface demeurent inchangées. Ce résultat suggère que l'adsorption continue de la protéine cesse pour des pressions supérieures à $8,9 \text{ mN m}^{-1}$ et que le film se comporte de façon élastique lorsqu'il est soumis à des compressions-expansions successives.

Nous pouvons constater à la Fig. 28 que lorsque la pression de surface est supérieure à $14,1 \text{ mN m}^{-1}$, les isothermes sont graduellement décalées vers des valeurs de pression et de potentiel plus faibles. Ce comportement inélastique du film peut être la conséquence d'une solubilisation graduelle du film à haute pression de surface ou d'une réorganisation importante de la structure.

Lorsque nous comparons les isothermes obtenues par compression simple et celles obtenues par compressions multiples, nous devons porter attention à un point particulier. La distinction entre les deux systèmes est présentée à la Figure 29. Lorsque nous superposons sur une échelle commune les isothermes Π - σ obtenues pour un film de cytochrome c soumis à une compression simple et ceux obtenus pour une compression multiple, nous pouvons constater que

les comportements observés pour des pressions inférieures à 8 mN m^{-1} sont identiques. Cependant, le comportement dans la phase de solubilisation du

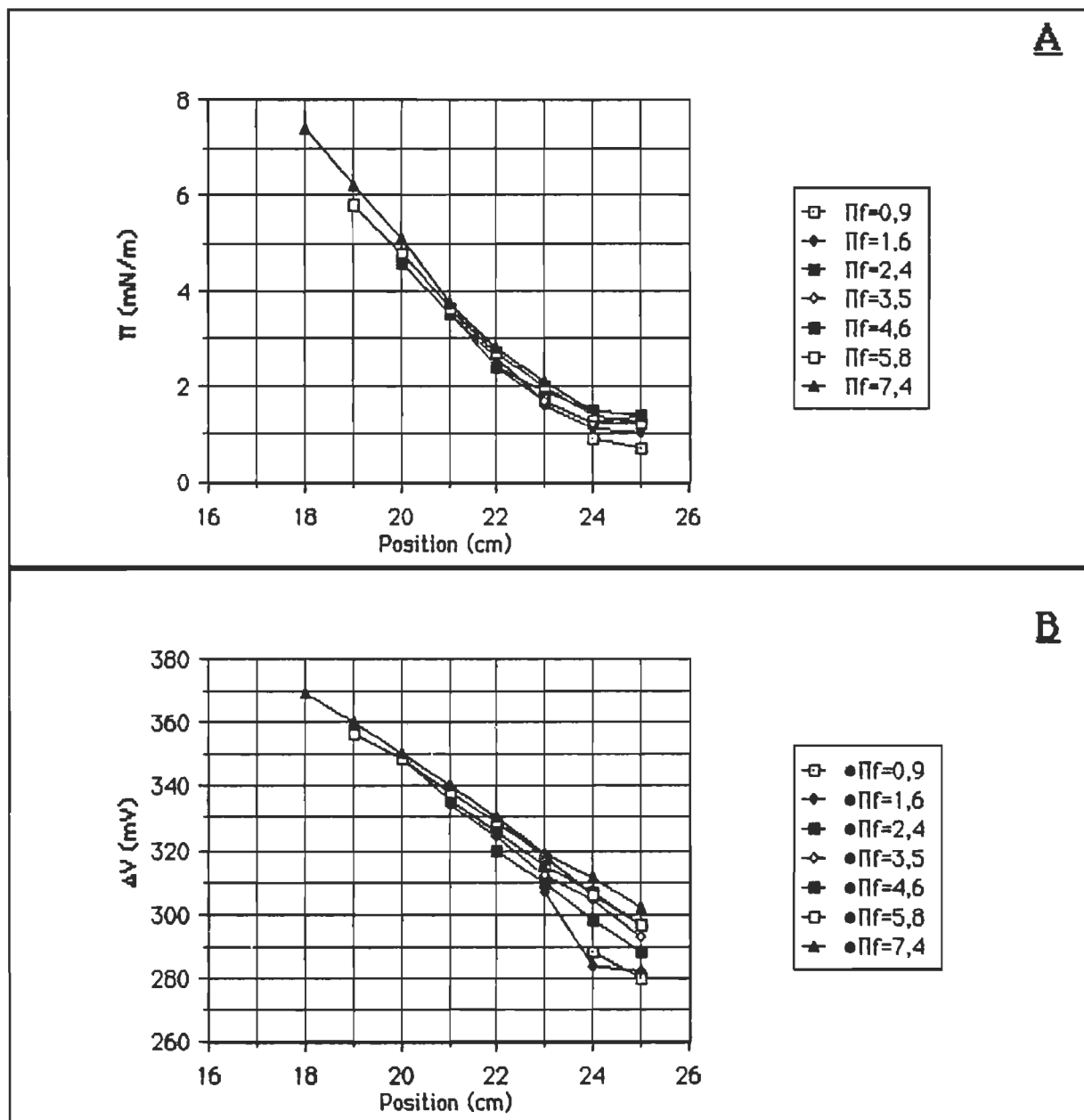


Figure 26. (A) Isothermes de pression (Π) et (B) de potentiel de surface (ΔV) d'un film de cytochrome c étalé à l'interface air-eau (tampon Tris 10^{-3}M , pH-8,0) par déposition solide. La figure présente les isothermes obtenues pour une série de cycles compression-expansion ayant pour référence une valeur de Π voisine de 0 mN m^{-1} et des limites supérieures de 0,9; 1,6; 2,4; 3,5; 4,6; 5,8; et $7,4 \text{ mN m}^{-1}$. Pour plus de clarté, cette figure ne présente que les isothermes obtenues en compression.

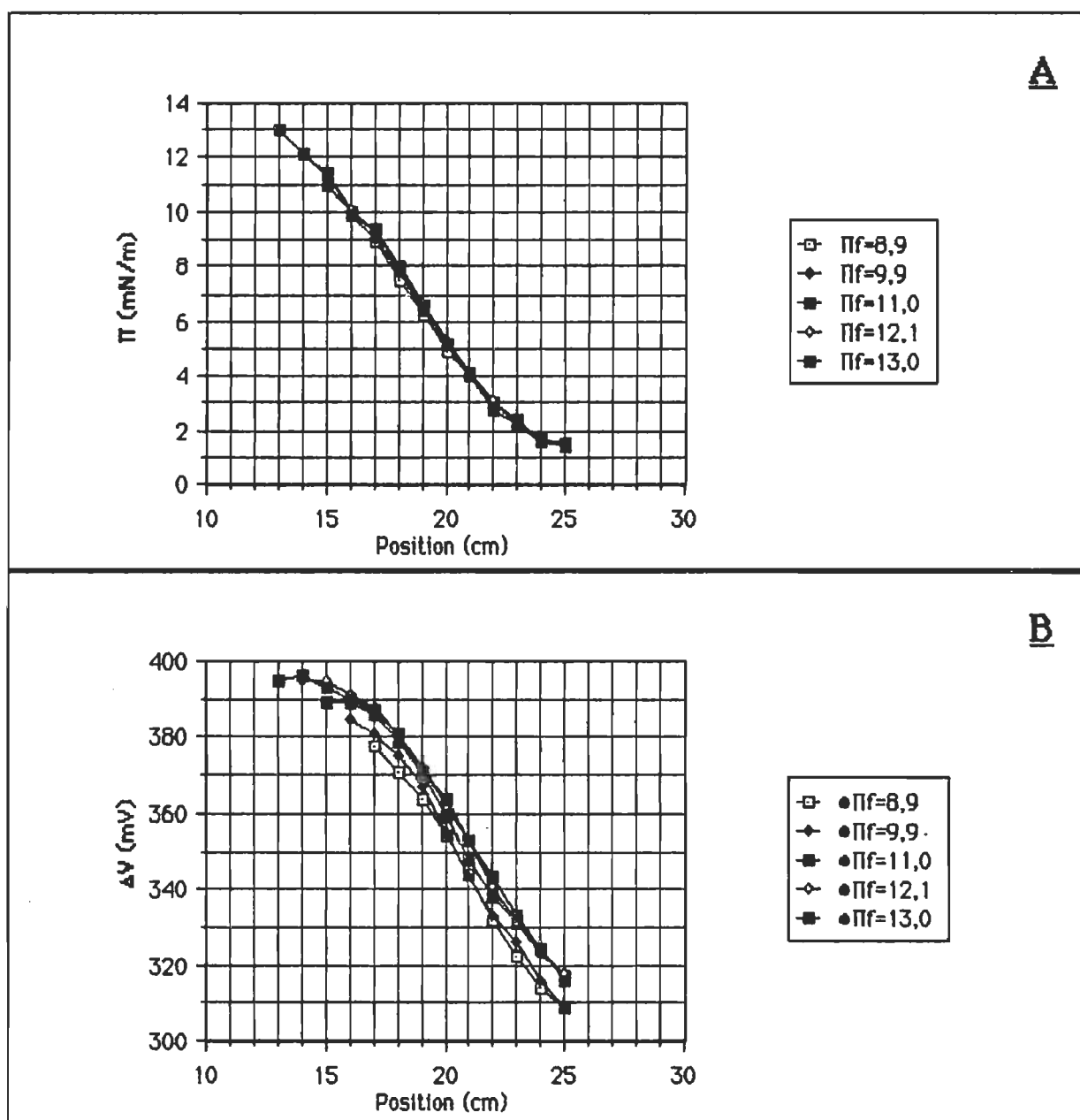


Figure 27. (A) Isothermes de pression (Π) et (B) de potentiel de surface (ΔV) d'un film de cytochrome c étalé à l'interface air-eau (tampon Tris 10^{-3}M , pH-8,0) par déposition solide. La figure présente les isothermes obtenues pour une série de cycles compression-expansion ayant pour référence une valeur de Π voisine de 0 mN m^{-1} et des limites supérieures de 8,9; 9,9; 11,0; 12,1 et $13,0 \text{ mN m}^{-1}$. Pour plus de clarté, cette figure ne présente que les isothermes obtenues en compression.

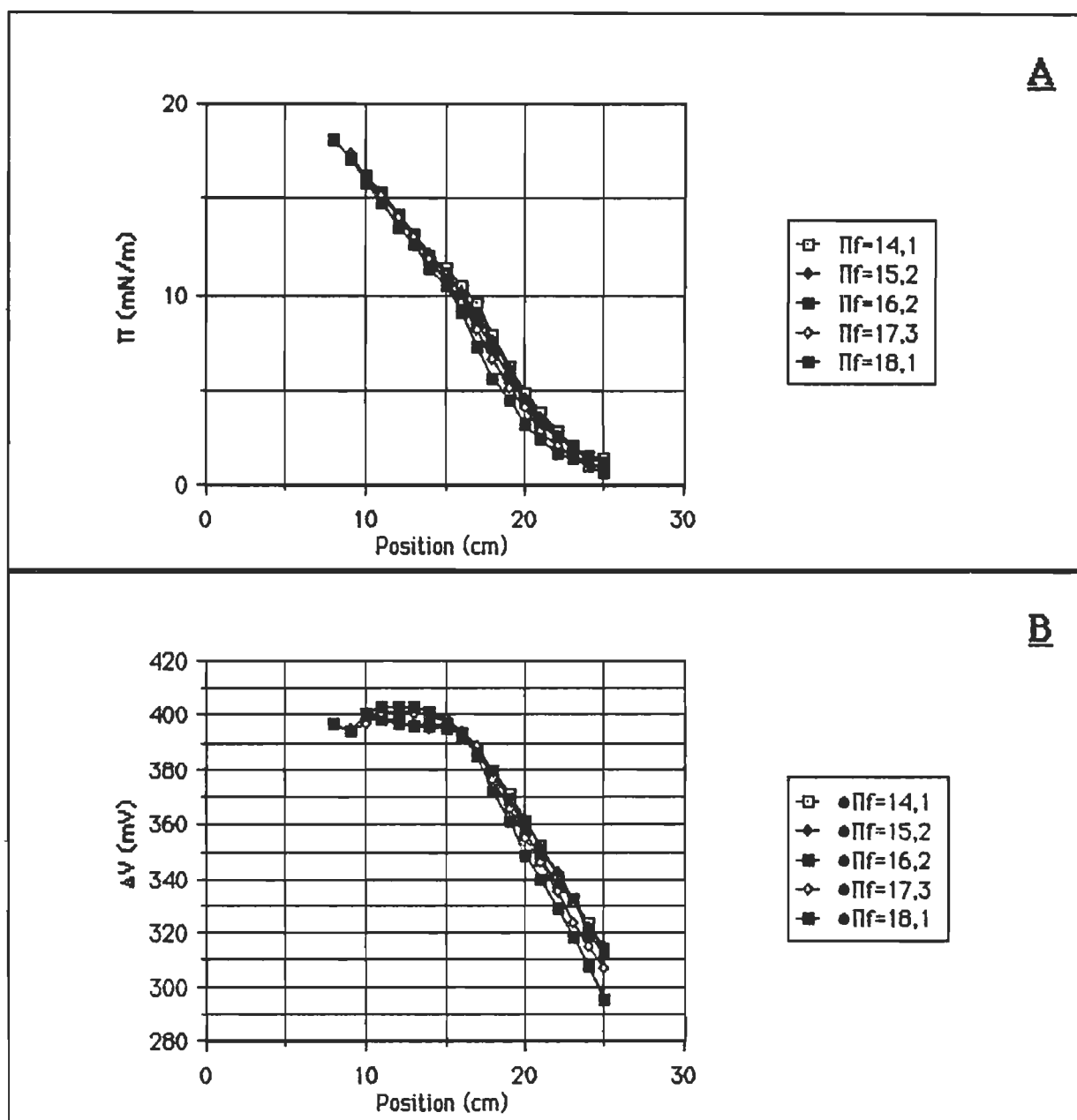


Figure 28. (A) Isothermes de pression (Π) et (B) de potentiel de surface (ΔV) d'un film de cytochrome c étalé à l'interface air-eau (tampon Tris 10^{-3}M , $\text{pH}=8,0$) par déposition solide. La figure présente les isothermes obtenues pour une série de cycles compression-expansion ayant pour référence une valeur de Π voisine de 0 mN m^{-1} et des limites supérieures de 14,1; 15,2; 16,2; 17,3 et 18,1 mN m^{-1} . Pour plus de clarté, cette figure ne présente que les isothermes obtenues en compression.

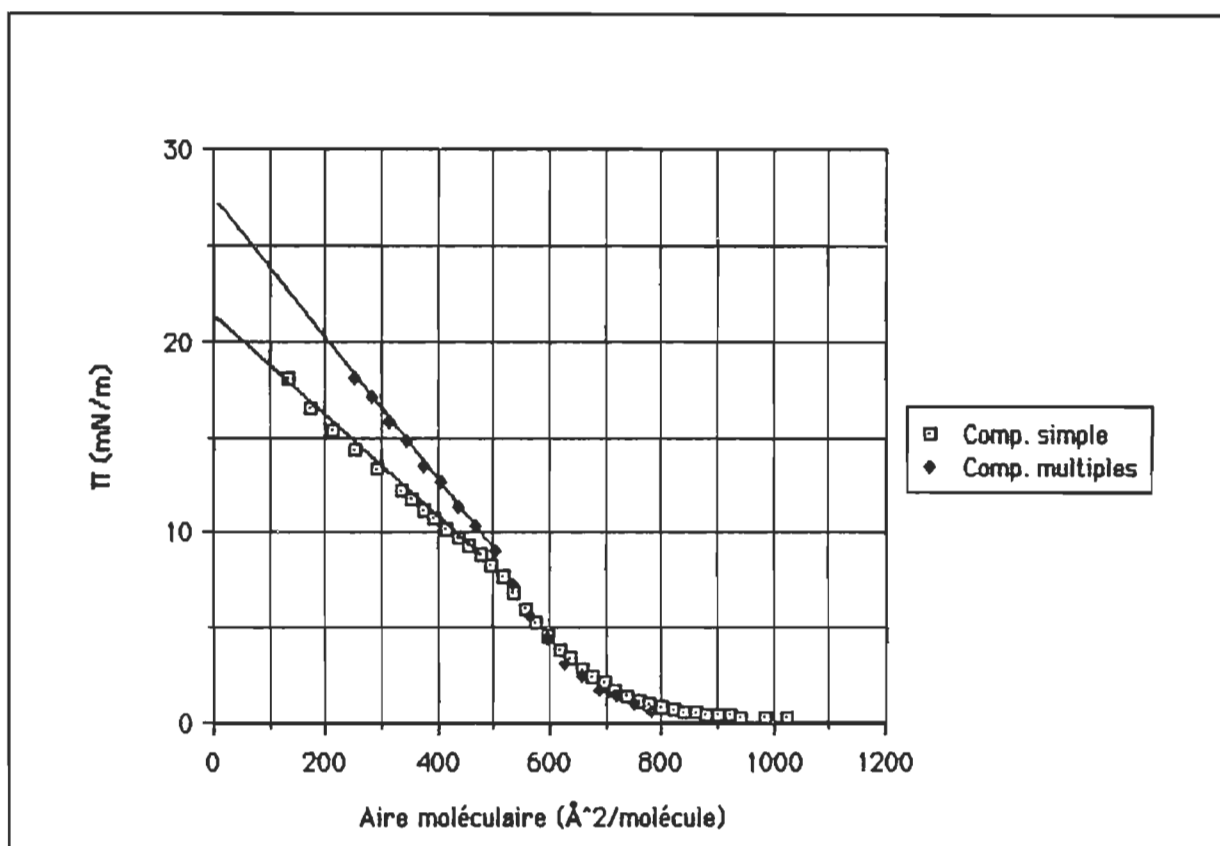


Figure 29. Comparaison des isothermes de pression de surface (Π) en fonction de l'aire moléculaire obtenues pour un film de cytochrome c soumis à une compression simple et un film soumis à une série de cycle compression-expansion. L'expulsion complète de la protéine, extrapolée lorsque σ tend vers $0 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$, est atteinte à un Π de 23 mN m^{-1} pour la compression simple alors que cette valeur est de 27 mN m^{-1} lorsque le film est soumis à des compressions multiples.

film protéique présente des différences dépendamment que la compression est simple ou multiple. La pression de surface extrapolée à aire moléculaire nulle est de 27 mN m^{-1} pour le film soumis aux compressions multiples alors qu'elle est de 23 mN m^{-1} lorsque nous effectuons une compression simple. Nous verrons subséquemment que cette différence peut également être observée pour les systèmes lipide-protéine et qu'elle est notée lorsque le film est laissé à de faibles pressions de surface.

3.5 Etablissement de l'isotherme pression de surface-aire moléculaire par la mesure de radioactivité de surface. Après la calibration du détecteur de radioactivité avec une monocouche de [1- ^{14}C] acide octadécanoïque, il est possible de déterminer, pour divers états de compression, la densité interfaciale d'un film de [1- ^{14}C]-cytochrome c. Il est également possible de convertir les densités interfaciales en aires moléculaires. Ce traitement fut effectué afin d'établir l'isotherme Π - σ présentée à la Figure 30. Malheureusement l'utilisation du détecteur de radioactivité contraint le mouvement de la barrière mobile à une position minimale de 12 cm. C'est cette contrainte expérimentale qui nous empêche de mesurer l'isotherme pour des pressions supérieures à 10 mN m $^{-1}$. Il nous est également impossible de déposer plus de molécules sans donner lieu à une pression non-nulle au maximum d'aire moléculaire.

En comparant les isothermes où l'aire moléculaire est estimée par densimétrie, considérant la surface disponible et le nombre de molécules présentes, ou par radioactivité, nous constatons que la densimétrie donne des aires moléculaires inférieures aux valeurs estimées par radioactivité de surface. Cette différence peut provenir du fait qu'une partie du matériel, déposé depuis une solution éthanolique, est entraîné dans la sous-phase. La comparaison des isothermes présentées à la Fig. 30 permet d'estimer à 25 % la quantité de matériel déposé qui passerait en solution. Il est également possible que l'étape du marquage modifie quelque peu les propriétés de surface du cytochrome c. Notamment, de légères différences sont observées entre

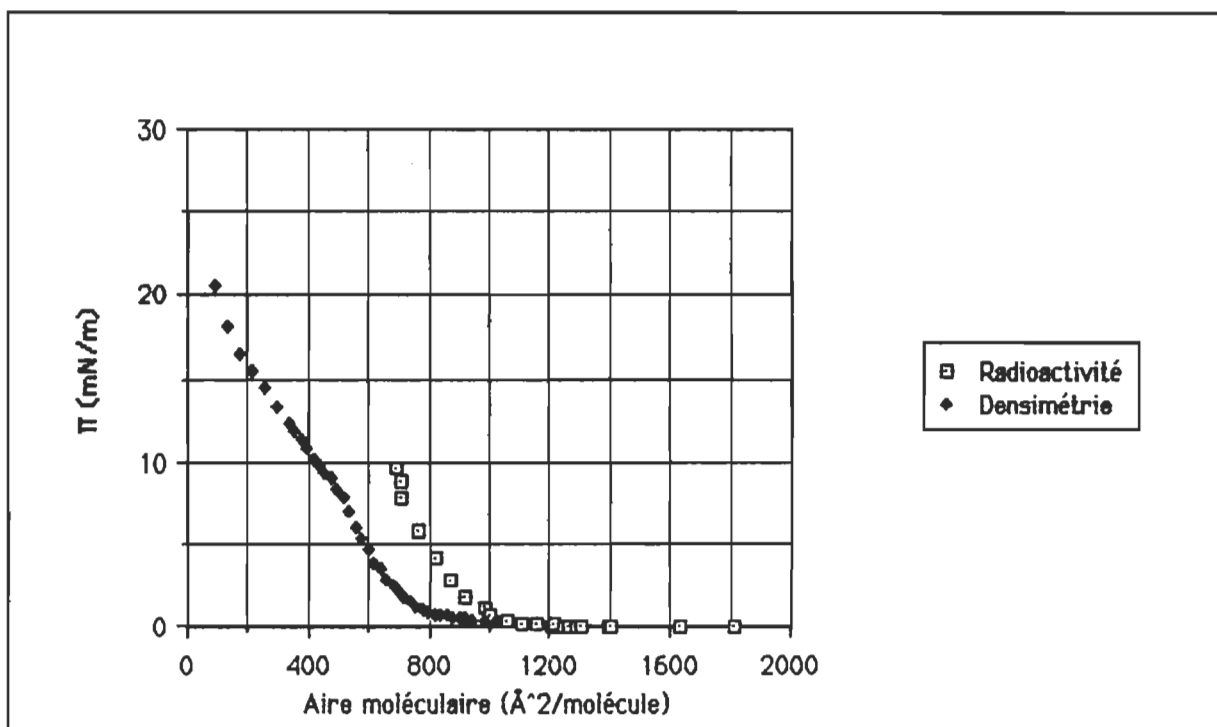


Figure 30. Comparaison des isothermes Π - σ obtenues pour un film de cytochrome c étalé à l'interface air-eau depuis une solution éthanol:eau (2:1,v:v). Les aires moléculaires sont établies en considérant que la surface disponible est totalement occupée par les molécules initialement déposées (densimétrie) ou par mesure de la radioactivité interfaciale (radioactivité). La portion de l'isotherme présentant des pressions de surface supérieure à 10 mN m⁻¹ n'a pu être établie, le détecteur empêchant le déplacement de la barrière mobile.

l'incorporation du cytochrome c natif et méthylé avec du ¹⁴C dans des monocouches de phosphatidylcholine.

3.6 Modèle de l'organisation moléculaire d'un film de cytochrome c soumis à une compression. L'isotherme de pression de surface d'un film de cytochrome c nous suggère que ce dernier se comporte comme un film insoluble de 0 à 8 mN m⁻¹. L'isotherme μ_1 - σ mesurée pour cette portion de l'isotherme montre une diminution du moment dipolaire alors que σ décroît.

Ce comportement est en accord avec l'hypothèse que ce sont les résidus polaires qui sont d'abord désorbés de l'interface lors de la compression. Au-delà de 8 mN m^{-1} , une solubilisation progressive du film se produit jusqu'à une pression limite de 23 mN m^{-1} . Outre la relation linéaire entre Π et σ , cette solubilisation est caractérisée par une décroissance linéaire du moment dipolaire μ_{\perp} atteignant une valeur extrapolée à $\sigma=0 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$ nulle. Ce résultat rejoint l'idée qu'au-delà de 8 mN m^{-1} , la portion de l'interface contribuant à la mesure de potentiel de surface est graduellement dépeuplée de matériel.

L'isotherme $-\delta\Delta-\sigma$ présenté à la Figure 23 présente une augmentation constante de $|\delta\Delta|$ lors de la compression. Nous avons vu que l'interprétation de ce seul résultat n'est pas simple. Ce comportement peut être la cause d'une augmentation de l'épaisseur du film, d'une augmentation de l'indice de réfraction du film, ou d'une combinaison des deux phénomènes. Comme seulement un des deux angles ellipsométriques peut être expérimentalement mesuré, il est impossible de calculer conjointement la densité interfaciale et l'épaisseur du film.

Les expériences de compression cyclique d'un film de cytochrome c depuis une pression de surface nulle jusqu'à une limite de pression maximale croissante permettent d'identifier trois zones distinctes; 1) de 0 à 8 mN m^{-1} , une adsorption continue de la protéine ou une relaxation conformationnelle se produit; 2) entre 8 et 14 mN m^{-1} , le film présente des isothermes $\Pi-\sigma$ indiquant un comportement élastique du film; 3) de 16 à 18 mN m^{-1} , nous

observons un décalage graduel des isothermes Π - σ indiquant une désorption de la protéine depuis l'interface jusqu'à la sous-phase ou une couche qui est adjacente. Le comportement du film soumis à un ensemble de cycles compression-expansion se distingue de celui observé pour des films soumis à une compression simple par l'augmentation de la pression limite où le film est solubilisé. Dans le cas d'une compression simple, $\Pi_{\sigma \rightarrow 0}$ vaut 23 mN m^{-1} alors que cette valeur est de 27 mN m^{-1} pour la compression multiple. Ce résultat laisse présager qu'en soumettant le film à des cycles compression-expansion, nous parvenons à forcer l'organisation à l'interface en accroissant la quantité de résidus hydrophobes présents. Comme les caractères hydrophobes et hydrophiles sont mieux démarqués à l'interface, un travail supplémentaire est requis afin d'expulser les portions protéiques enrichies en résidus hydrophobes. Ce phénomène peut être une explication de la dénaturation de surface des protéines.

L'ensemble de ces résultats nous permettent de formuler le modèle présenté à la Figure 31. Aux pressions de surface inférieures ou égales à 8 mN m^{-1} , la protéine peut s'adsorber depuis la sous-phase ou relaxer vers un état de plus grande aire moléculaire. C'est entre 8 et 14 mN m^{-1} que le mécanisme de désorption des résidus polaires prend place. Ce processus grandement réversible atteint un équilibre très rapidement, de telle sorte que les isothermes obtenues en compression et en décompression sont identiques. Au-delà de 14 mN m^{-1} , ce sont les résidus de plus grande hydrophobicité qui sont exclus de l'interface. Les intermédiaires conformationnels, formés entre 14 et 23 mN m^{-1} , sont des formes quasi-solubilisées et présentent des conformations

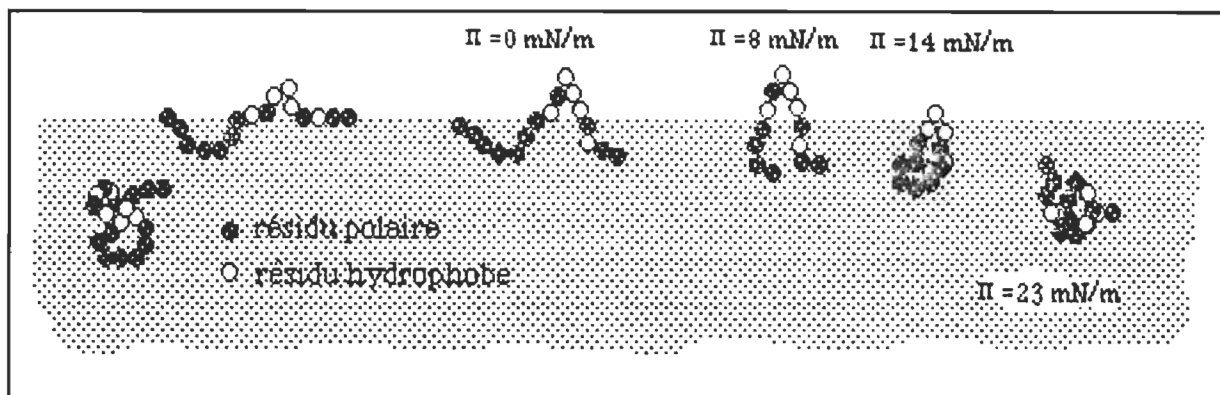


Figure 31. Représentation schématique du comportement d'un film de cytochrome c comprimé à diverses pressions de surface. De 0 à 8 mN m⁻¹, le film peut relaxer vers son état d'énergie minimale. De 8 à 14 mN m⁻¹, les résidus ou segments de polarité élevée sont graduellement désorbés de l'interface. De 14 à 23 mN m⁻¹, ce sont les résidus hydrophobes qui sont exclus de l'interface.

se rapprochant de la conformation native du cytochrome c. La transition inverse impliquant le passage des intermédiaires métastables vers la forme étalée n'est pas instantanément réversible et requiert une réadsorption de la protéine. Au-delà de 23 mN m⁻¹, la totalité du film de protéine est solubilisé dans la sous-phase ou dans une phase adjacente à l'interface.

Le dernier point duquel nous désirons traiter concerne l'organisation des films protéiques à l'interface air-eau. Toutes les études traitant des propriétés interfaciales des films protéiques entendent que l'organisation de la protéine est principalement régie par la polarité des résidus, ou des sections de résidus, présents dans la protéine. Ainsi, nous pouvons distinguer le comportement interfacial des protéines hydrophiles et hydrophobes. Cette séparation des caractères hydrophile et hydrophobe suppose une réorganisation, un étalement de la protéine à l'interface. Nous devons cependant prendre conscience que, dans les conditions que nous avons utilisées, ce déploiement de

la structure protéique ne peut qu'être partiel. En solution, le cytochrome c est une protéine sphérique possédant un diamètre de 35 Å (Stryer (1981)). La section de cette protéine est donc approximativement de 960 Å² molécule⁻¹. Les aires moléculaires mesurées pour le film de cytochrome c étalé depuis une solution éthanol:eau (2:1, v:v) sont du même ordre de grandeur, laissant supposer que la structure étalée à l'interface air-eau comporte une fraction importante des résidus immergés ou qu'une portion non-négligeable du matériel est solubilisée dans la sous-phase.

CHAPITRE 4

LE SYSTEME BINAIRE DIOLEOYLPHOSPHATIDYLCHOLINE-CYTOCHROME C

4.1 Les propriétés interfaciales de la dioléoylphosphatidylcholine

Les données concernant les propriétés interfaciales des différents phospholipides synthétiques abondent dans la littérature. Notre but en effectuant cette étude sommaire n'est pas d'apporter de nouvelles informations concernant le comportement interfacial de la PC(18:1) mais bien de comparer la procédure expérimentale et les performances de notre système de mesure.

La Figure 32 présente les isothermes Π - σ , ΔV - σ et $\delta\Delta$ - σ obtenues pour la PC(18:1). A température ambiante, l'isotherme de pression de surface présente les caractéristiques d'un film dans l'état liquide expansé. La montée de pression de surface s'effectue à une aire de $106 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$. Tout comme pour l'acide octadécanoïque (consulter l'Annexe A), les propriétés du film de part et d'autre du point de montée de Π sont fort différentes. Les mesures de potentiel de surface et de déphasage ellipsométrique présentent de grandes instabilités pour des aires inférieures au point de montée. La gamme des fluctuations s'étend depuis une valeur nulle jusqu'à la valeur stable, mesurée alors qu'un signal de Π apparaît. Alors que le signal de pression de surface est mesuré, les valeurs de ΔV et $\delta\Delta$ deviennent stables. Une mesure préliminaire de radioactivité de surface du $[^{14}\text{C}]$ PC(18:1) nous a de plus permis de

constater que, tout comme rapporté à l'Annexe A, des fluctuations de la densité interfaciale sont observées lorsque $\sigma > 106 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$. Toutes ces mesures réunies laissent supposer que le film lipidique est hétérogène aux faibles états de compression et qu'il devient macroscopiquement homogène lorsque $\sigma < 106 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$.

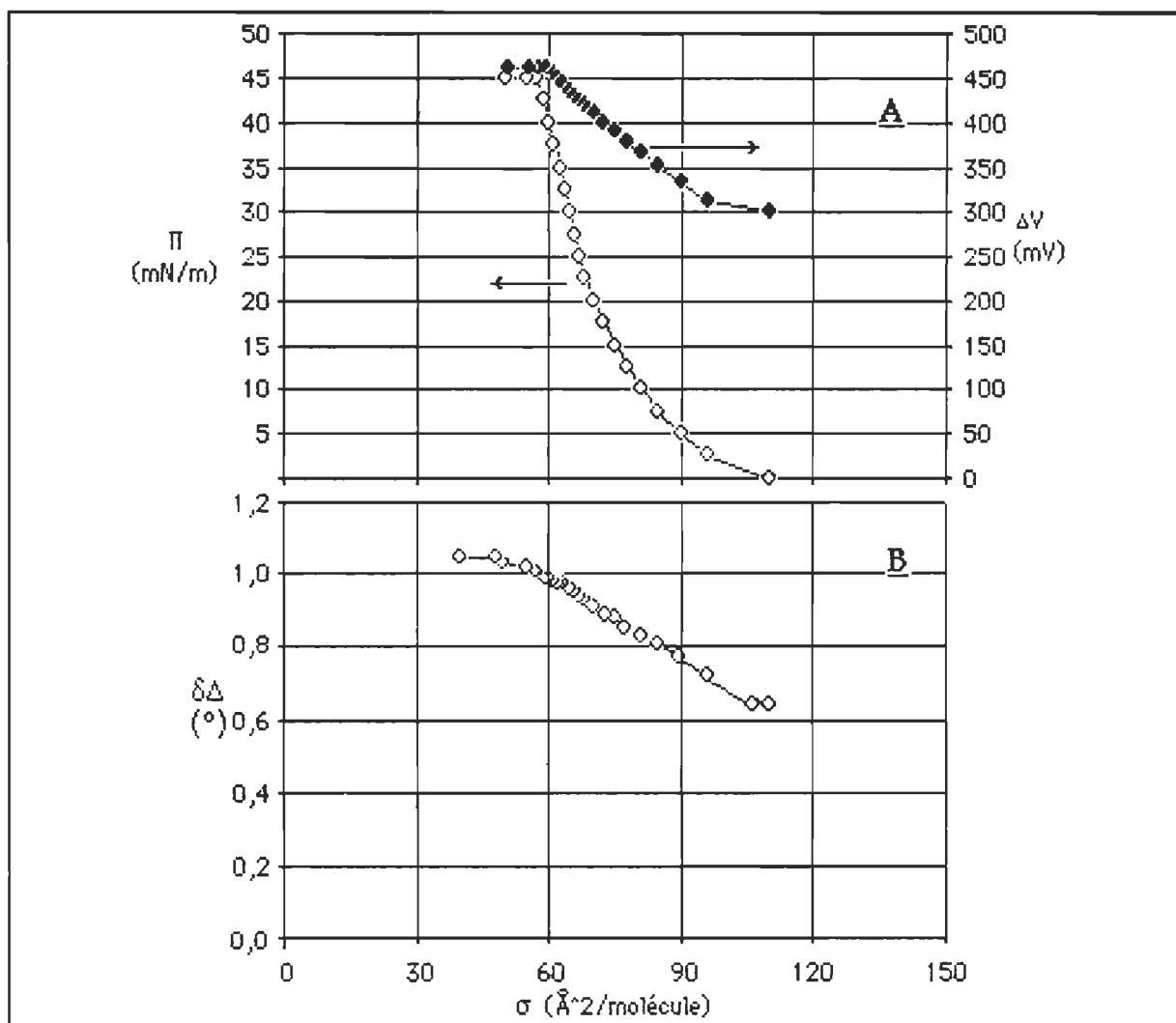


Figure 32. A) Isothermes de pression de surface (Π)-aire moléculaire (σ), potentiel de surface (ΔV)- σ et B) déphasage ellipsométrique ($-\delta\Delta$)- σ obtenues pour la PC(18:1) étalée à l'interface air-tampon Tris-HCl 10^{-3} M, pH-8,0 en utilisant le benzène comme solvant d'étalement. La température fut maintenue à $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Vitesse de compression de $5 \pm 2 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Conditions d'opération de l'ellipsomètre: $\phi = 60^\circ$ et $\lambda = 6328 \text{ \AA}$.

Le collapse du film se produit à des aires moléculaires comprises entre 42 et 45 mN m⁻¹. Nous n'avons pu trouver d'explication sur la variabilité de cette valeur. Le collapse est caractérisé par un plafonnement des mesures de Π , de ΔV et de $\delta\Delta$. Les valeurs de ΔV et $\delta\Delta$ mesurées au collapse sont respectivement 465 mV et -1,03°.

Tableau 4
Comparaison des isothermes de pression de surface-aire moléculaire de la PC(18:1)

Pression de surface (Π , mN m ⁻¹)			Aire moléculaire (σ , Å ² molécule ⁻¹)		
5	96	94	97	90	90
10	84	86	87	81	80
15	76	79	80	74	75
20	71	75	73	69	70
25	67	69	69	65	67
30	63	66	66	61	64
35	61	61	64	58	62
Référence	(1)	(2)	(3)	(4)	(ce travail)
Sous-phase	0,1M NaCl	eau	Tampon PO ₄	Tampon PO ₄	Tampon Tris
Température(°C)	22,0	20,0	20,5	19,5	20,0
Solvant d'étalement	-	CHCl ₃	C ₆ H ₆	C ₆ H ₆	C ₆ H ₆
Balance	Langmuir	Wilhelmy	Langmuir	Langmuir	Langmuir

(1) Phillips et coll. (1970)

(2) Bishop et coll. (1980)

(3) Tancrede et coll. (1981)

(4) Ducharme et coll. (1985)

La comparaison entre l'isotherme Π - σ rapportée à la Figure 32 et diverses isothermes rapportées dans la littérature est présentée au Tableau 4. Nous avons également regroupé dans ce tableau les diverses conditions dans lesquelles les mesures furent effectuées. L'isotherme que nous présentons, tout comme celle rapportée par Ducharme et coll.(1985), diffère légèrement de celles rapportées par Phillips et coll. (1970), Bishop et coll. (1980) et Tancrede et coll. (1982). La déviation maximale de l'aire moléculaire est de -7

$\text{\AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$ à 5 mN m^{-1} . Ces différences s'atténuent alors que la pression de surface augmente. Il est important de tenir compte du fait qu'à l'opposé de la balance de Langmuir, la balance de Wilhelmy présente un maximum de précision aux faibles pressions de surface. Ainsi, la balance de Wilhelmy est plus affectée par les différences de sous-phase aux faibles valeurs de Π . Considérant cette différence, ainsi que les diverses conditions expérimentales utilisées, nous trouvons un relatif accord entre nos valeurs et celles rapportées dans la littérature. Quoiqu'il en soit, c'est aux différences existant entre l'isotherme du lipide seul et l'isotherme du mélange lipide-protéine que nous porterons notre attention. Les isothermes $\Delta V-\sigma$ et $\delta\Delta-\sigma$ que nous présentons à la Figure 32 sont en accord avec les valeurs rapportées par Ducharme et coll.(1985).

4.2 Les propriétés interfaciales du système mixte PC(18:1)-cytochrome c

4.2.1 Le simple cycle expansion-compression. La superposition des isothermes $\Pi-\sigma$, $\Delta V-\sigma$ et $\delta\Delta-\sigma$ obtenues pour la PC(18:1) et le système mixte PC(18:1)-cyt c est présentée à la Figure 33. Pour ce type d'expérience, la protéine fut injectée sous un film de PC(18:1) initialement comprimé à 20 mN m^{-1} . Après homogénéisation de la sous-phase à l'aide du système de prismes, la monocouche mixte fut décomprimée, puis recomprimée jusqu'au collapse du film. Après l'injection de la protéine et l'homogénéisation de la sous-phase, aucune des propriétés de surface n'est modifiée, indiquant que la protéine n'est pas incorporée au film lipidique à cette pression de surface. Ce fait est en accord avec les mesures de Quinn et Dawson (1969b) établissant que la

pression maximale d'incorporation du cytochrome c dans une monocouche de PC extraite du jaune d'oeuf est de 20 mN m^{-1} .

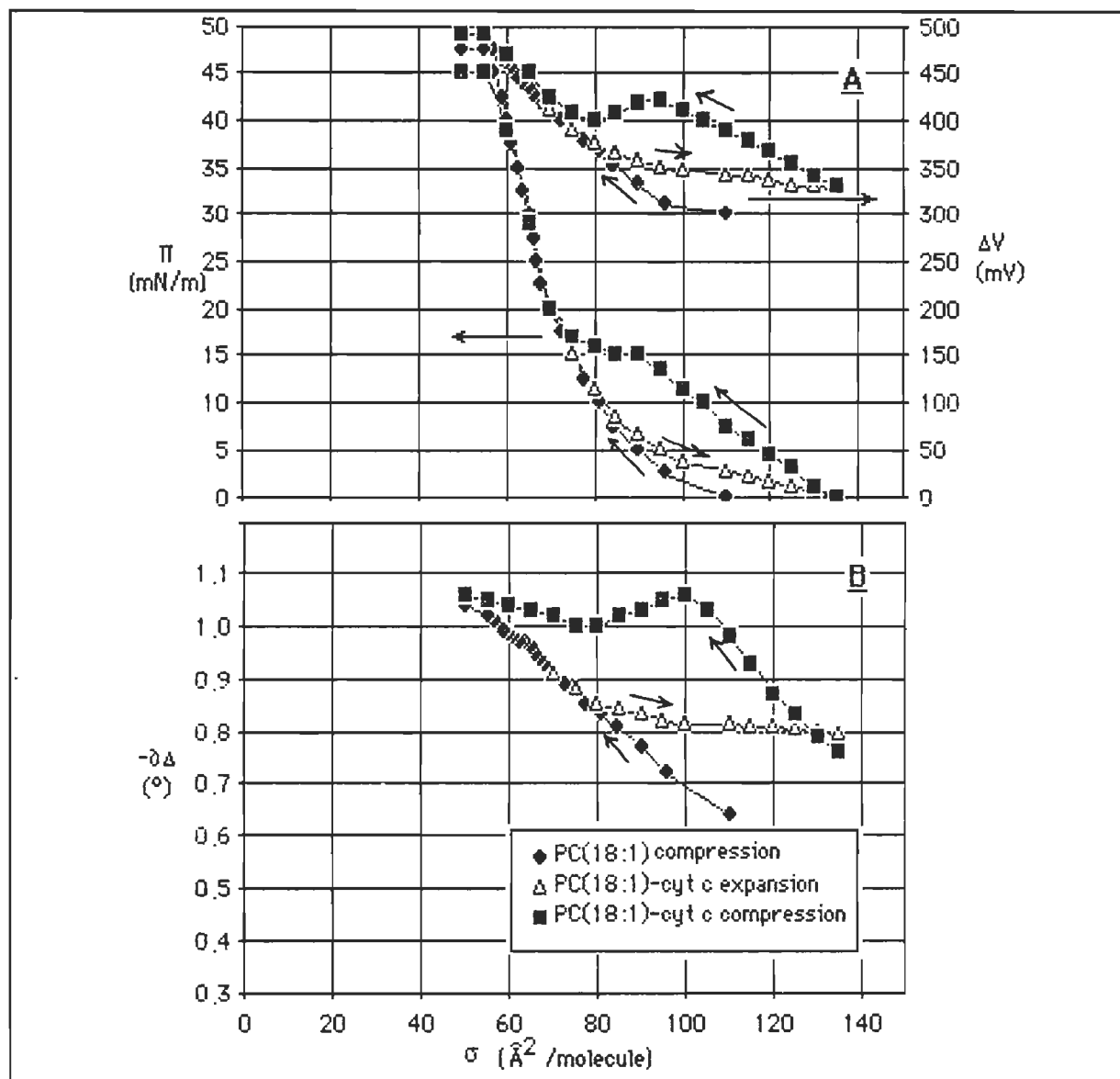


Figure 33. A) Isothermes de pression de surface (Π)-aire moléculaire (σ), de potentiel de surface (ΔV)- σ et B) de décalage ellipsométrique ($-\Delta\Delta$)- σ obtenues pour la PC(18:1) et pour le système mixte PC(18:1)-cyt c. Suite à la compression de la monocouche de PC(18:1) à une pression de surface de 20 mN m^{-1} , le cytochrome c est injecté puis le film mixte est décomprimé puis recomprimé jusqu'au collapse. Conditions expérimentales: Tampon Tris 10^{-3} M , pH-8,0, température - $20 \pm 1^\circ \text{C}$, [cyt c] - $2,3 \times 10^{-7} \text{ M}$. Pour la mesure ellipsométrique, $\phi = 60^\circ$ et $\lambda = 6328 \text{ \AA}$.

Lors de la décompression, un décalage graduel de l'isotherme Π - σ du lipide est mesuré. Plus la pression de surface est faible, plus la différence d'aire, Δa , entre l'isotherme Π - σ du lipide seul et du mélange lipide-protéine est grande. Ce décalage est également observé sur les isothermes ΔV - σ et $\delta\Delta$ - σ mesurées en décompression. Lors de la recompression, la différence d'aire entre l'isotherme du lipide et celui du mélange lipide-protéine (Δa) est constante à $25 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$ de 0 à 14 mN m^{-1} . A 14 mN m^{-1} , l'isotherme Π - σ présente une inflexion et l'isotherme du système mixte rejoint rapidement celle du lipide. Au-delà de 20 mN m^{-1} , les isothermes Π - σ du lipide et du mélange PC(18:1)-cyt c sont indiscernables. L'isotherme ΔV - σ obtenue en recompression présente un maximum ($\Delta V=425 \text{ mV}$) coïncidant avec l'inflexion observée sur l'isotherme Π - σ . Au-delà de ce maximum, l'isotherme de potentiel de surface décroît jusqu'à rejoindre l'isotherme obtenue pour le lipide seul. Le comportement de l'isotherme ellipsométrique est identique, quoique le sommet de $\delta\Delta$ soit légèrement décalé comparativement à ceux identifiés depuis les isothermes Π - σ et ΔV - σ . De plus, les valeurs de $|\delta\Delta|$ mesurées alors que Π est supérieur à 20 mN m^{-1} demeurent légèrement supérieures aux valeurs mesurées pour le lipide seul.

Ce comportement est en accord avec une incorporation réversible de la protéine dans la monocouche lipidique. Suite à l'injection de la protéine, il est nécessaire d'abaisser la pression de surface afin de favoriser l'incorporation de la protéine. Comme observé en compression, cette incorporation est régie par la pression de surface: de 0 à 14 mN m^{-1} , la protéine demeure incorporée dans

la monocouche, de 14 à 20 mN m⁻¹, la protéine en est graduellement exclue et au-delà de 20 mN m⁻¹, la protéine est entièrement resolubilisée. Le fait qu'il existe une légère différence entre les valeurs de $\delta\Delta$ mesurées pour le lipide seul et pour le système mixte au-delà de 20 mN m⁻¹ peut découler du fait que la protéine est éjectée dans une phase adjacente à la monocouche et redevient plus facilement disponible pour une réincorporation. Ce point sera traité ultérieurement.

4.2.2 Les cycles expansion-compression multiples opérés depuis forte pression de surface. La section précédente a traité du comportement du système PC(18:1)-cyt c soumis à un cycle expansion-compression. Nous avons montré que l'incorporation de la protéine dans la couche lipidique est contrôlée par la pression de surface. Afin de mieux mettre en relief ce comportement, nous avons soumis le système PC(18:1)-cyt c à une série de cycles expansion-compression opérés depuis une pression de surface de référence de 30 mN m⁻¹ et ayant comme limite inférieure des pressions de surface décroissantes. Ce genre d'expérience prend en moyenne quatre heures à être complétée. C'est le maximum de temps qui peut être utilisé afin de mener l'expérience puisque nous avons noté qu'après ce temps, malgré la présence de la cloison prévue pour contrer cet effet, il y a adsorption de protéine à la surface du compartiment de référence. Le film adsorbé en appliquant une contre-pression sur le flotteur a pour effet de réduire la pression mesurée. Pour cette raison, nous n'avons pu mesurer l'isotherme ellipsométrique de ces cycles, devant nous limiter à la mesure continue des pressions et des potentiels de surface. Il est pratiquement impossible de

contrôler l'incorporation de la protéine dans la monocouche pour une expérience si longue. En effet la quantité de protéine adsorbée dépend de la concentration du cytochrome c, de la manière dont l'agitation est effectuée et du temps que le système passe à faible pression de surface. Comme, pour ce genre d'expérience, nous ne pouvons contrôler parfaitement le dernier paramètre, il est impossible d'obtenir, pour les expériences d'expansion-compression, des cycles d'incorporation identiques. Pour cette raison, les résultats présentés ne sont pas des moyennes. Nous mentionnons toutefois que ce type d'expérience a été effectué six fois et que les résultats présentés sont représentatifs des forces et faiblesses du modèle proposé.

Les isothermes Π - σ présentées à la Figure 34 furent obtenues en soumettant le système PC(18:1) à six cycles expansion-compression depuis une pression de référence de 30 mN m^{-1} . Nous avons précédemment mentionné qu'à cette pression, le cytochrome c est exclu du film. Les pressions minimales des premier, deuxième et troisième cycles sont de 11,1; 3,8 et $1,0 \text{ mN m}^{-1}$. Lors des cycles subséquents, la pression de surface minimale atteinte était nulle. Cette série d'isothermes nous permet de constater que plus le film est décomprimé, plus la quantité de protéine incorporée, mesurée par la différence d'aire moléculaire à pression fixe, est grande. Malgré le fait que les trois derniers cycles possèdent une pression minimale identique, nous pouvons tout de même observer qu'il y a un accroissement du Δa , différence des aires (σ) mesurées pour le lipide seul et le mélange lipide-protéine. Ce phénomène est la conséquence du plus long temps passé à pression nulle, ce qui permet à une plus grande quantité de protéine de s'incorporer dans le film.

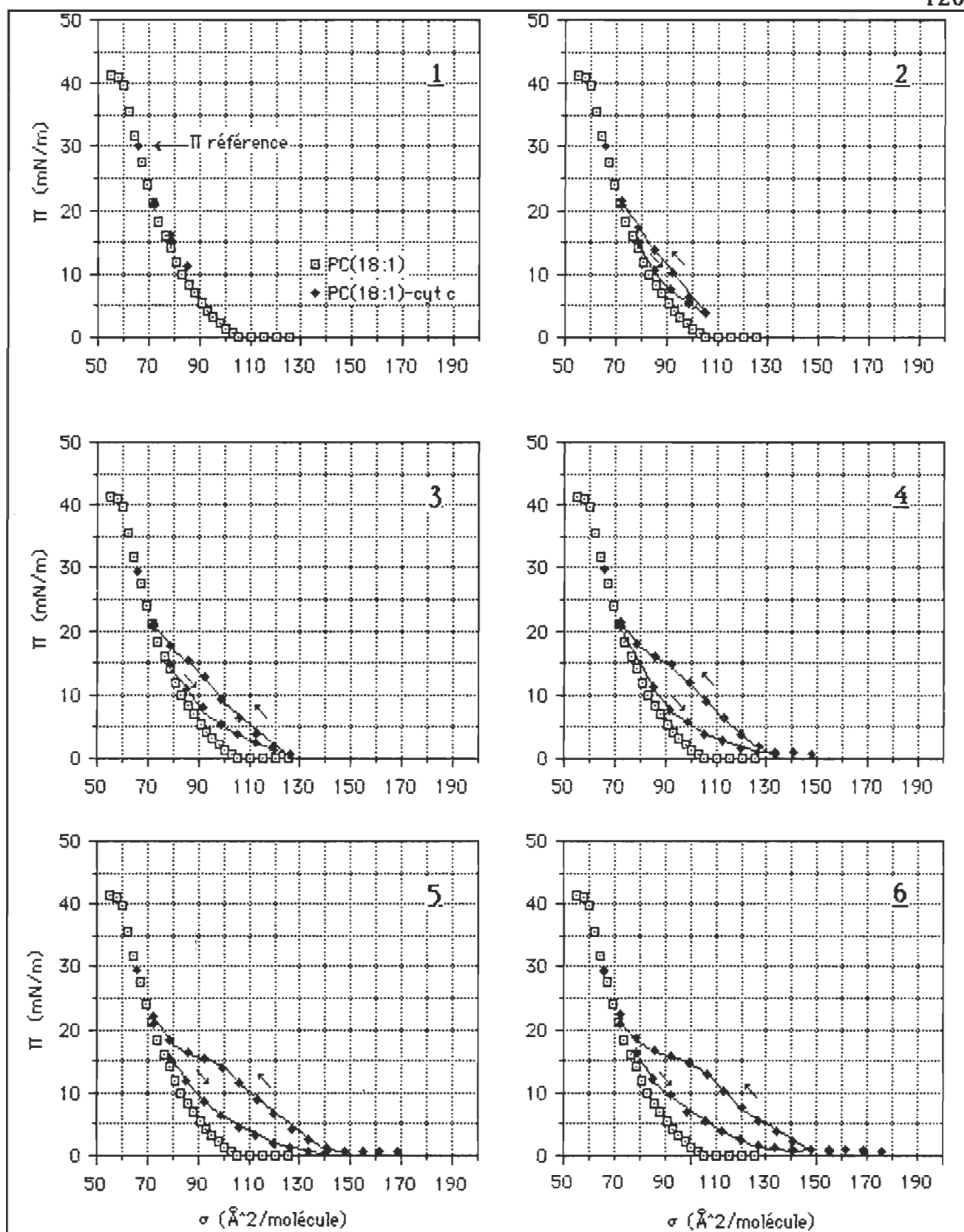


Figure 34. Isothermes Π - σ obtenues pour la PC(18:1) et pour le système mixte PC(18:1)-cytochrome c. Le cytochrome c fut injecté à une pression de 30 mN m⁻¹. C'est à partir de cette valeur (Π ref.) que six cycles expansion-compression furent amorcés. La pression minimale de chacun de ces cycles est décroissante. Sous-phase: Tampon Tris 10⁻³ M, pH-8,0. [cyt c] = 2,3 x 10⁻⁷ M.

Les isothermes ΔV - σ obtenues lors de la même expérience sont présentées à la Figure 35. Le saut de potentiel de surface, rapporté à la Section 4.1, est représenté pour le lipide pur et pour le système lipide-protéine. Dans les deux cas, ces fluctuations sont observées lorsque la pression de surface mesurée est nulle. L'hystérèse notée sur les isothermes ΔV - σ du système PC(18:1)-cyt c s'accroît alors que la quantité de protéine incorporée augmente. En plus, le sommet observé en recompression se déplace aux aires moléculaires présentant l'inflexion de la courbe Π - σ . Ces deux comportements dépeignent la solubilisation de la protéine à partir d'un certain état de compression déterminé par la pression de surface.

La conversion des potentiels de surface en moments dipolaires a été effectuée et ces résultats sont présentés à la Figure 36. Quel est donc la signification de la valeur de μ_1 résultant de l'organisation de deux corps à l'interface? Pour deux composés insolubles étalés à l'interface air-eau, le potentiel de surface du mélange comprimé à une pression Π (ΔV_{12}^Π) est donné par:

$$\Delta V_{12}^\Pi = \chi_1 \Delta V_1^\Pi + \chi_2 \Delta V_2^\Pi \quad (4.1)$$

où χ_1 et χ_2 sont les fractions molaires des composés 1 et 2, alors que ΔV_1^Π et ΔV_2^Π sont les potentiels de surface mesurés pour les corps purs comprimés à une pression de surface Π . Conséquemment, nous pouvons dire que le moment dipolaire perpendiculaire du mélange est égal à la moyenne pondérée des moments dipolaires des constituants. Ainsi, pour le mélange lipide-protéine, nous pouvons écrire que:

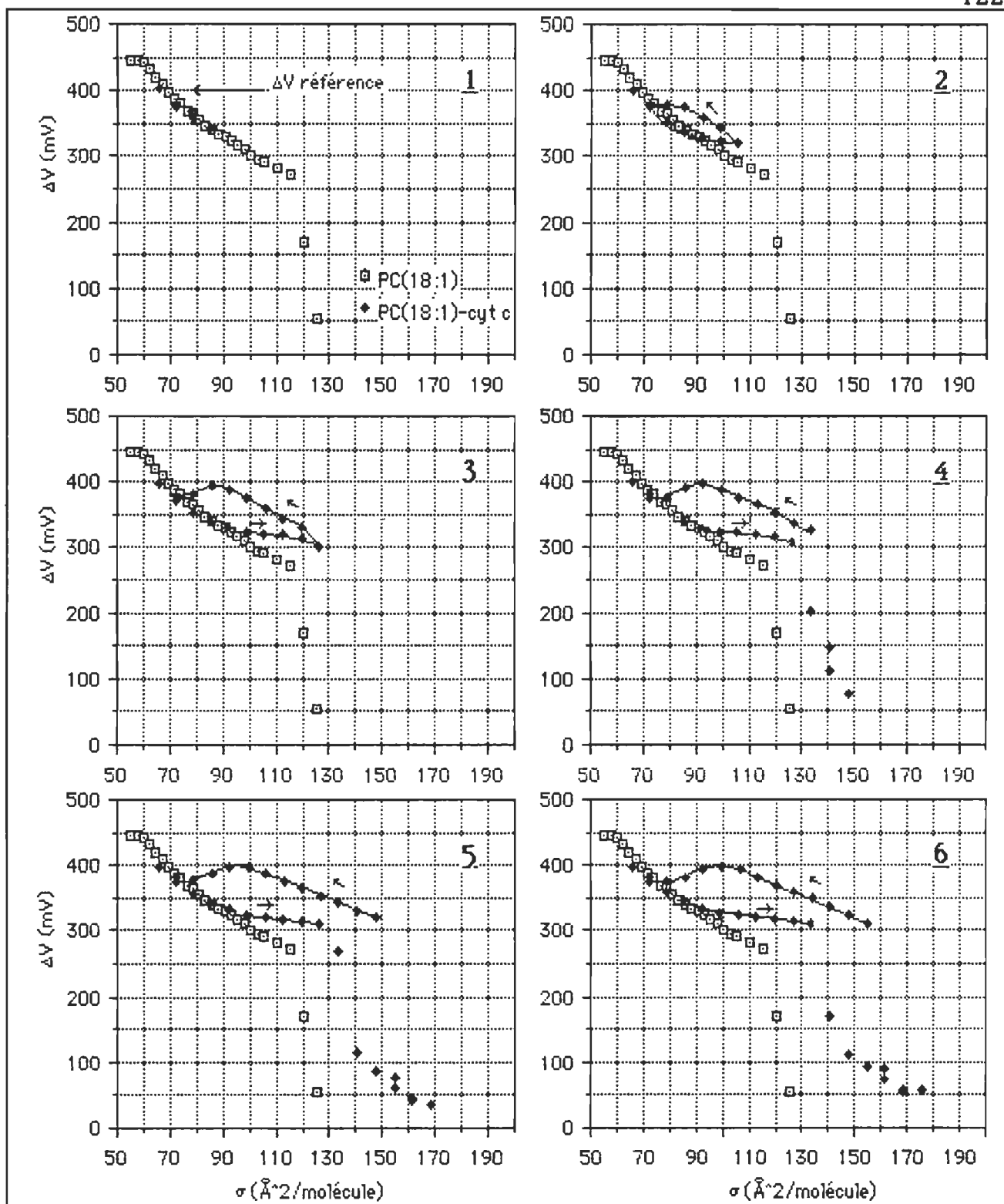


Figure 35. Isothermes ΔV - σ obtenues pour la PC(18:1) et pour le système mixte PC(18:1)-cytochrome c. Le cytochrome c fut injecté à une pression de 30 mN m^{-1} . Le potentiel de surface à la pression de référence est de +400 mV. C'est à partir de cette valeur (ΔV ref.) que six cycles expansion-compression furent amorcés. La pression minimale de chacun de ces cycles est décroissante. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles rapportées à la Fig.34.

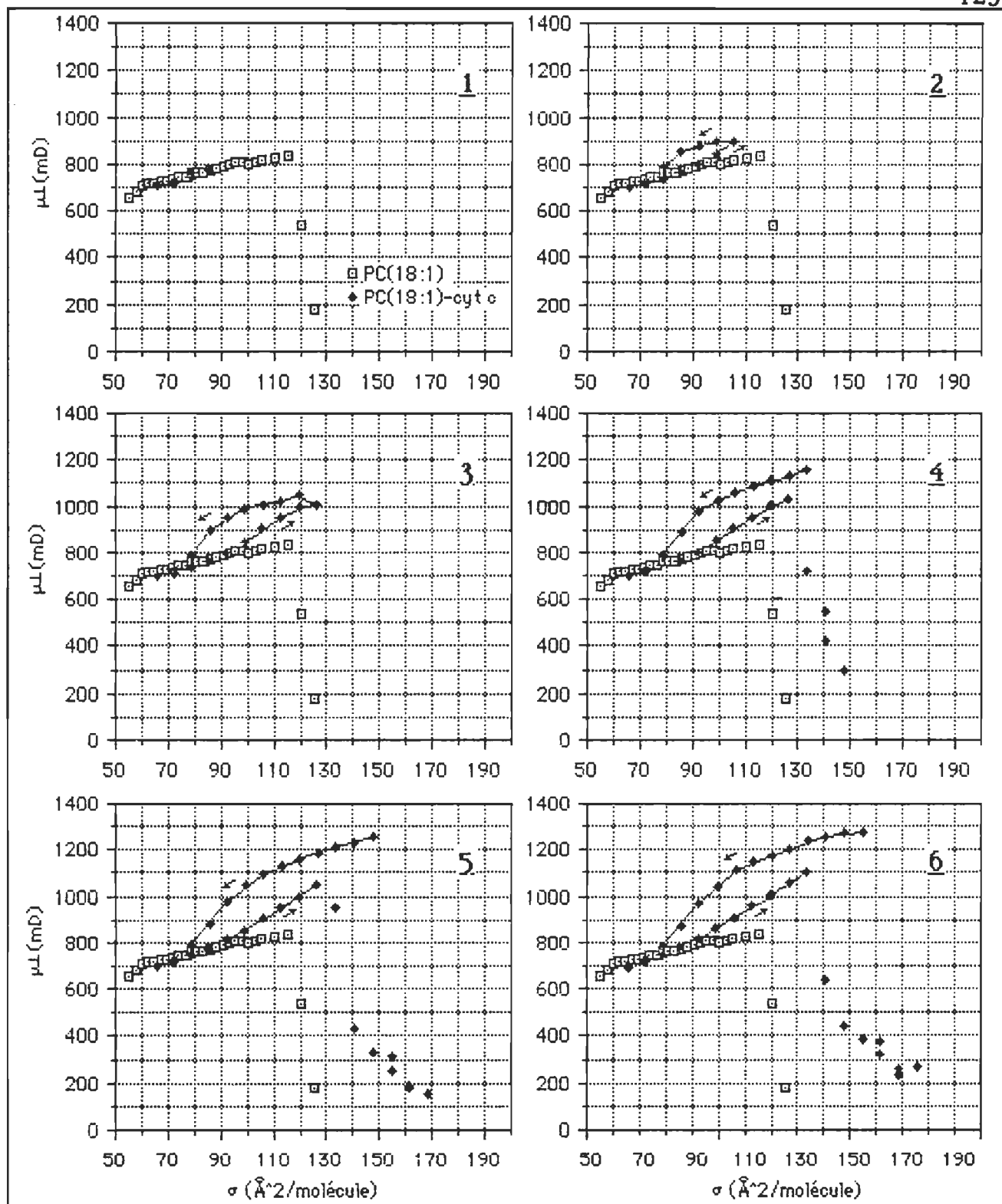


Figure 36. Isothermes μ_L - σ obtenues pour la PC(18:1) et pour le système mixte PC(18:1)-cytochrome c. Le cytochrome c fut injecté à une pression de 30 mN m^{-1} . C'est à partir de cette valeur ($\Pi \text{ ref.}$) que six cycles expansion-compression furent amorcés. La pression minimale de chacun de ces cycles est décroissante. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles rapportées à la Fig. 34.

$$\mu_{LP}^{\Pi} = \mu_{L}^{\Pi} + n_r^{\Pi} \mu_r^{\Pi} \quad (4.2)$$

où μ_{LP}^{Π} est le moment dipolaire mesuré pour le système lipide-protéine soumis à une pression Π , μ_L^{Π} est le moment dipolaire mesuré pour le lipide comprimé à cette pression, n_r^{Π} le nombre d'équivalents-résidus associés à chaque lipide dans le mélange et μ_r^{Π} le moment dipolaire par équivalent-résidu pour la protéine comprimée dans un état Π .

C'est à cause de l'incertitude que nous avons concernant l'aire réelle occupée par le cytochrome c que nous devons introduire le concept d'équivalent-résidu. Ce concept, qui n'est pas un nombre absolu, tend à définir les propriétés moyennes d'aire et de μ_L de chaque résidu d'acide aminé à partir des isothermes Π - σ et ΔV - σ obtenues pour les films de cytochrome c étalés depuis une solution éthanol:eau (2:1, v:v). Cette transformation est une grossière approximation de la réalité puisqu'elle postule l'équivalence de tous les résidus composant la protéine. Nous avons montré au chapitre précédent que le cytochrome c se comporte comme une monocouche insoluble de 0 à 8 mN m⁻¹. Au-delà de cette limite, une solubilisation progressive du film se produit. Ainsi, les aires moléculaires, données par équivalent-résidu, ne sont le reflet de la réalité qu'entre 0 et 8 mN m⁻¹; les valeurs mesurées au-delà de cette limite représentent la solubilisation et non pas la compression du film. Les aires par équivalent-résidu (σ_r^{Π}) furent estimées depuis la portion comprise entre 0 et 8 mN m⁻¹ de l'isotherme Π - σ présentée à la Fig. 22 en divisant les aires moléculaires par 104, le nombre de résidus d'acides aminés

composant le cytochrome c. Au-delà de 8 mN m^{-1} , l'aire fut considérée constante à $5,3 \text{ Å}^2 (\text{éq. résidu})^{-1}$.

Les variables de l'Eq. 4.2 sont toutes accessibles expérimentalement. La valeur de μ_{LL}^{Π} peut être déduite de la Figure 32, la valeur de μ_{LR}^{Π} est présentée pour divers états de compression à la Fig. 22. Pour les mêmes raisons présentées précédemment, les valeurs de μ_{LR}^{Π} considérées pour des pressions de surface supérieures à 8 mN m^{-1} sont considérées constantes à $51 \text{ mD} (\text{éq. résidu})^{-1}$. La seule quantité qui n'est pas accessible depuis les isothermes du lipide ou de la protéine est n_r^{Π} . Cette quantité est calculée à partir de l'isotherme du mélange lipide-protéine selon la relation:

$$n_r^{\Pi} = \Delta a / \sigma_r^{\Pi} \quad (4.3)$$

où Δa est la différence d'aire moléculaire entre l'isotherme du mélange et l'isotherme du lipide considérée à une pression de surface donnée, et σ_r^{Π} est déterminé depuis l'isotherme obtenue pour le film de cytochrome c.

La Figure 37 présente la comparaison entre les μ_L résultant de la transformation des isothermes $\Delta V - \sigma$ présentées à la Figure 35 et des valeurs calculées en conformité avec les Eqs. 4.2 et 4.3. Comme c'est la pression de surface qui régularise l'incorporation du cytochrome c dans les films de PC(18:1), nous utilisons Π comme base de comparaison.

L'accord entre les valeurs mesurées et calculées est excellent lors de la phase expansion de l'ensemble des cycles. Lors de la phase compression, des

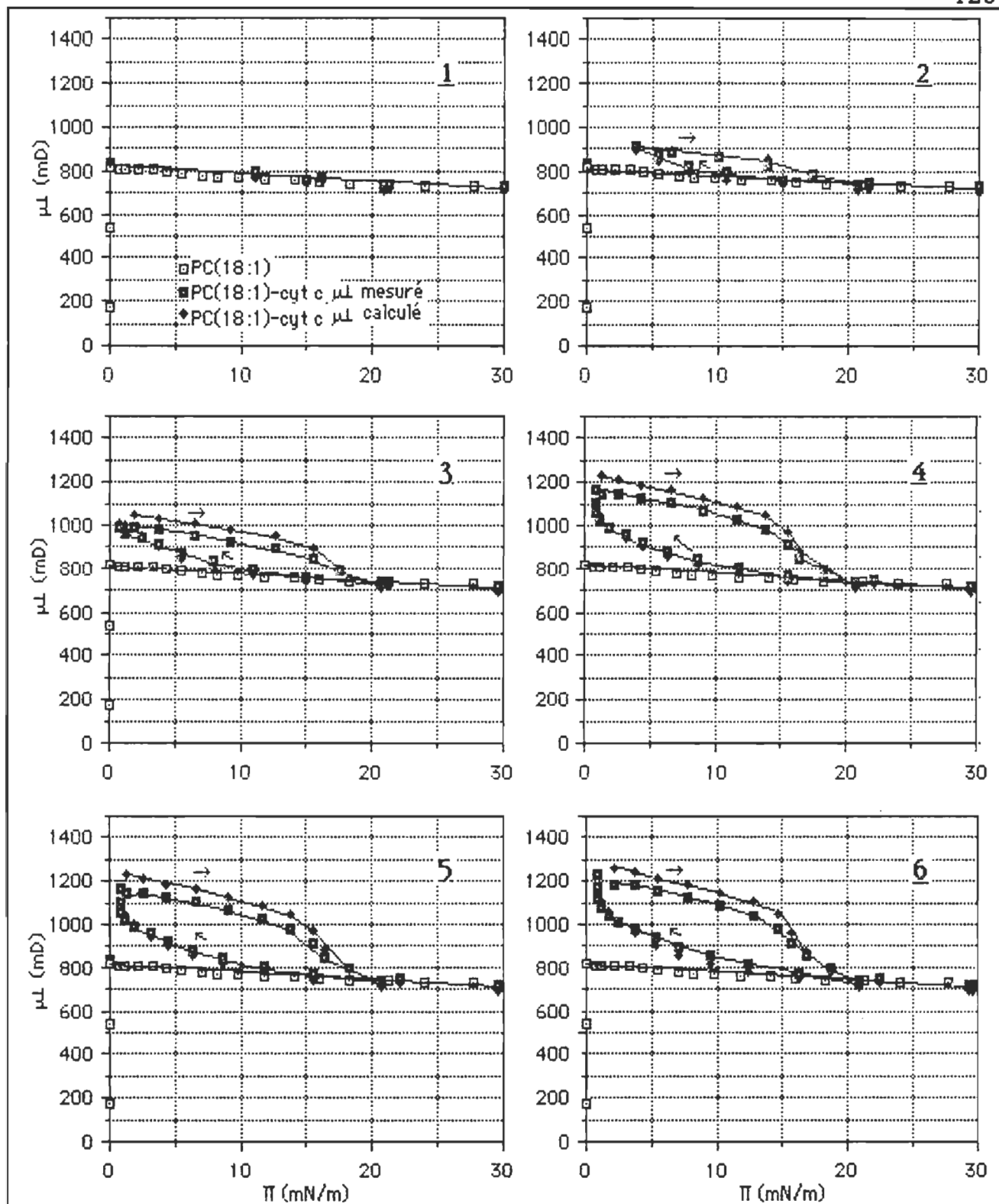


Figure 37. Relation entre le moment dipolaire (μ_L) et la pression de surface pour la PC(18:1) et pour le système mixte PC(18:1)-cyt c soumis à six cycles expansion-compression. La figure présente les μ_L mesurés et les valeurs calculées selon les Eqs. 4.2 et 4.3. Ces valeurs furent établies d'après les Figs. 34 et 35.

différences moyennes de 50 mD sont observées entre les valeurs mesurées et calculées. En plus, ces différences sont relativement constantes du début de la compression jusqu'à l'éjection de la protéine. D'où provient cette différence observée en compression, d'un changement du moment dipolaire du lipide, de la protéine, ou des deux?

En considérant une incertitude de $\pm 1 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$ sur les isothermes du lipide et du mélange, nous estimons une erreur absolue sur le moment dipolaire calculé variant entre 25 et 40 mD. Si cette erreur était la cause de l'écart, la différence serait observée autant lors de l'expansion que lors de la compression, or ce n'est pas le cas. En référant à la Figure 38, qui présente la relation qui existe entre le nombre de résidus ($n_{r\Pi}$) et la pression de surface, nous constatons que le nombre de résidus s'accroît lors de l'expansion et qu'en compression le nombre de résidus incorporés demeure relativement constant jusqu'à ce que la pression de 14 mN m⁻¹ soit atteinte. Si la différence notée entre les μ_1 mesurés et calculés était seulement imputable à une mauvaise estimation du moment dipolaire de la protéine, l'écart serait croissant lors de l'expansion, alors que le nombre de résidus de protéine incorporé augmente. Or, cet écart n'est pas fonction de la quantité d'équivalents-résidus incorporée puisqu'il n'est noté que lors de la phase compression et qu'il est de même amplitude pour les cycles 3 et 6, alors que $n_{r\Pi}$ maximal est respectivement de 3 et 6,8 éq. résidus par lipide. Comme les informations disponibles présentement sont insuffisantes, ce point sera traité ultérieurement à la lueur de résultats complémentaires.

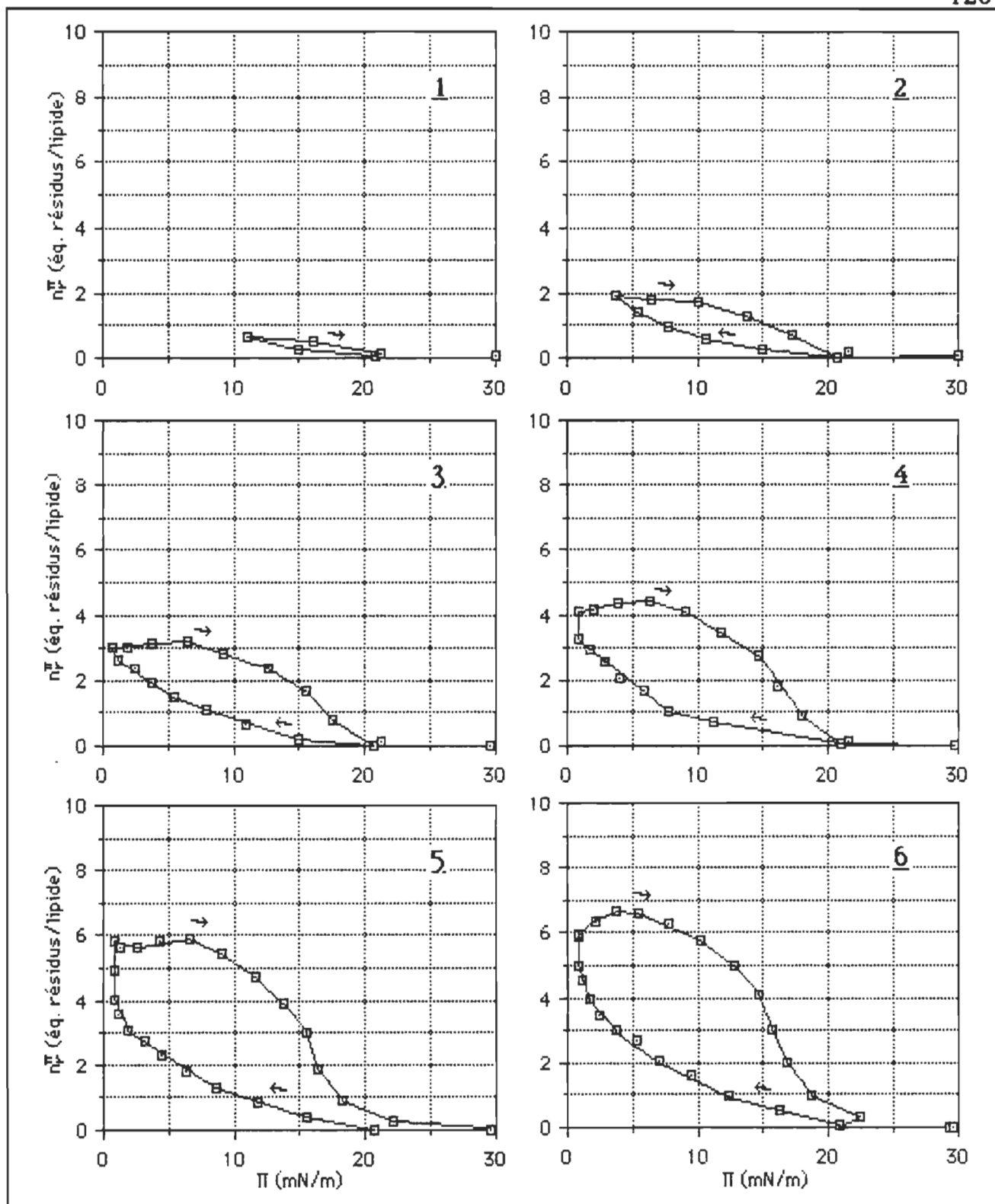


Figure 38. Relation entre le nombre d'équivalents-résidus par lipide, n_r^Π , et la pression de surface Π pour le système mixte PC(18:1)-cytochrome c soumis à six cycles expansion-compression. Ces valeurs furent établies d'après la Fig. 34 et l'Eq. 4.3.

La transformation des différences notées entre les isothermes du lipide et du mélange lipide-protéine peuvent être exprimées, comme il est présenté à la Figure 38, en nombre d'équivalents-résidus associés à chaque lipide. Il est important de garder en mémoire que cette forme de présentation des résultats nous donne une vue globale de la moyenne de la quantité d'équivalents-résidus de protéine associée à chaque lipide; elle ne nous permet aucunement de statuer sur l'homogénéité du mélange.

Une expression alternative de cette quantité fut introduite par Taneva et coll. (1984): la fraction molaire de protéine, χ_p . Cette quantité est exprimé par:

$$\chi_p = z n_p / (n_p z + n_L) \quad (4.4)$$

où z est le nombre de résidus composant la protéine P; n_p , le nombre de résidus de protéine et n_L le nombre de lipide. Comme les aires moléculaires des isothermes que nous présentons sont toujours exprimées par lipide, n_L vaut l'unité. Alternativement nous exprimerons la fraction molaire résiduelle, χ_r^Π , par la relation:

$$\chi_r^\Pi = n_r^\Pi / (n_r^\Pi + 1) \quad (4.5)$$

où n_r^Π a la signification qui lui a été accordée à l'Eq. 4.3. La Fig. 39 présente la fraction molaire résiduelle, telle que calculée selon l'Eq. 4.5, en fonction de la pression de surface, pour les six cycles présentés à la Fig. 34. Cette expression de l'incorporation du cytochrome c dans une monocouche de PC(18:1) confirme également la réversibilité de l'incorporation de la protéine. En

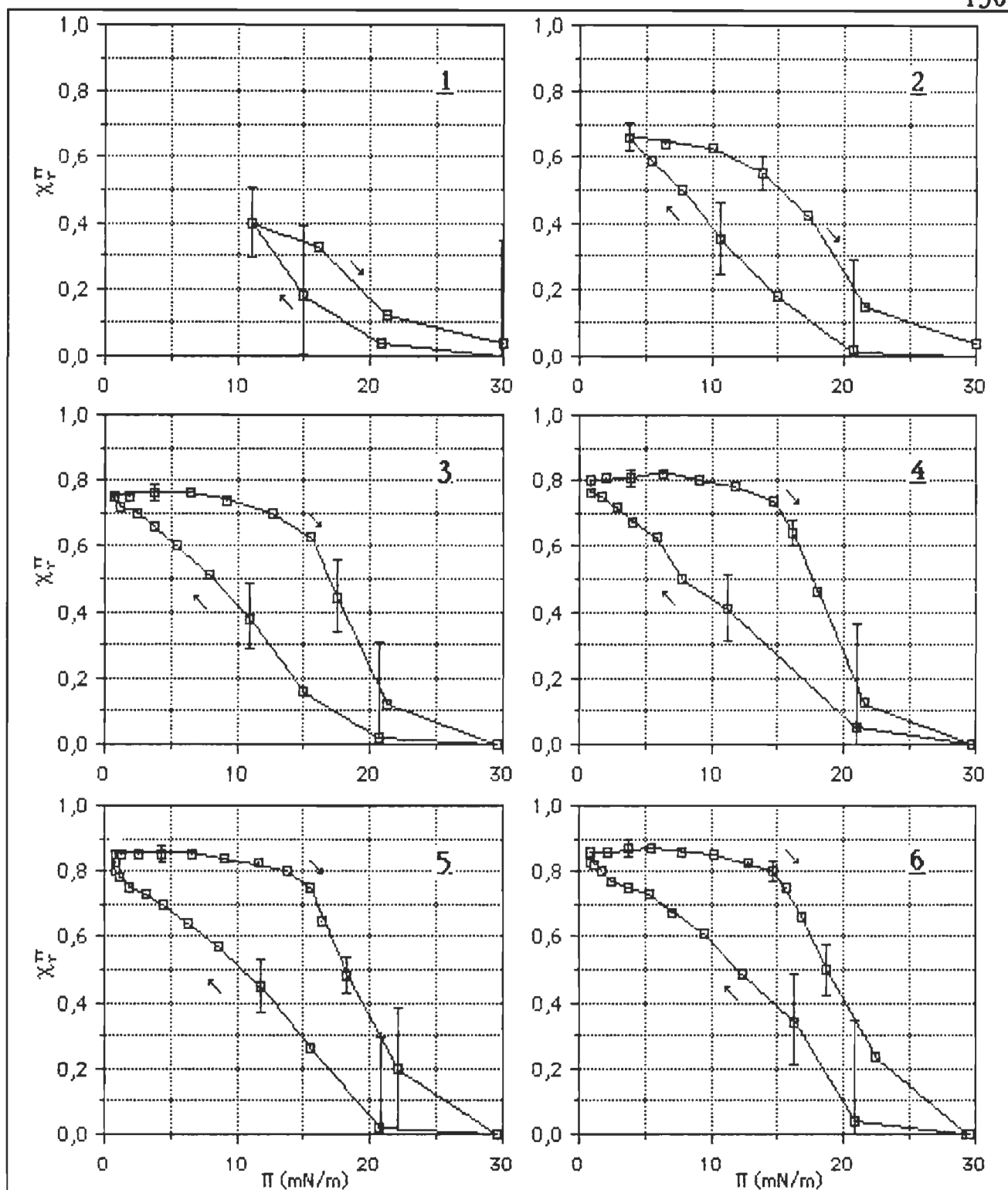


Figure 39. Relation entre la fraction molaire de protéine, χ_r^π , et la pression de surface Π pour le système mixte PC(18:1)-cytochrome c soumis à six cycles expansion-compression. La protéine fut injectée à 30 mN m^{-1} et c'est à cette même pression que les cycles furent amorcés. Les incertitudes furent calculées en considérant une erreur de $\pm 1 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$ sur les aires moléculaires de la PC(18:1) et du mélange PC(18:1)-cytochrome c déterminées aux valeurs de Π données. Ces valeurs furent établies d'après la Fig. 34 et l'Eq. 4.5.

décompression, pour des pressions inférieures à 20 mN m^{-1} , la fraction molaire résiduelle croît constamment jusqu'à atteindre un maximum au point d'inversion du cycle. Lors de la compression, la fraction molaire résiduelle demeure relativement constante depuis la pression minimale jusqu'à $14\text{-}15 \text{ mN m}^{-1}$, endroit à partir duquel elle décroît rapidement jusqu'à zéro. Considérant l'incertitude sur la valeur de $\chi_r\Pi$, cette quantité redevient nulle entre 20 et 25 mN m^{-1} .

La Fig. 39 inclut les incertitudes qui correspondent à une variation de $\pm 1 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$ sur les isothermes du lipide pur et du mélange lipide-protéine. Cet écart est représentatif de l'erreur expérimentale sur la détermination de l'aire moléculaire. L'incertitude se fait d'autant plus importante que la différence Δa est faible. En moyenne, l'incertitude relative sur une fraction molaire résiduelle de $0,20$ est de $\pm 100\%$.

Le comportement distinct du système PC(18:1)-cyt c lors de l'expansion ou de la compression provient du fait qu'une fois incorporée, la protéine demeure stabilisée dans le film. Cette stabilisation provient soit de l'interaction entre la protéine et le lipide, soit de la simple tendance que possède le cytochrome c à s'adsorber aux interfaces. Cependant, ce système lipide-protéine présente un comportement distinct du film de cyt c pur puisque la pression d'éjection du film mixte est de 14 mN m^{-1} , alors qu'elle était de 8 mN m^{-1} pour le film protéique. Dans les deux cas, l'éjection de la protéine est complète au-delà de $\Pi = 23 \text{ mN m}^{-1}$.

Afin de pouvoir statuer sur la miscibilité de la protéine dans le film de lipide, deux étapes sont requises: la vérification de la position du collapse apparent pour des fractions molaires différentes et la vérification de la loi d'additivité des aires moléculaires. Le premier critère veut, en accord avec la loi des phases de Crisp, que la position du collapse apparent ne dépende pas de la fraction molaire des deux composés pour un mélange immiscible. En plus, la monocouche dans laquelle les composants sont immiscibles doit obéir à la loi d'additivité :

$$A_{12} = \chi_1 A_1 + \chi_2 A_2 \quad (4.6)$$

où A_{12} est l'aire du mélange à une pression Π , χ_1 et χ_2 sont respectivement les fractions molaires des constituants 1 et 2 qui composent le mélange, A_1 et A_2 les aires moléculaires de ces composés purs à une pression Π .

Même si pour le mélange PC(18:1)-cyt c, la pression de surface où se produit l'éjection de la protéine du film de lipide demeure inchangée alors que la concentration interfaciale de protéine augmente, nous devons appliquer la conclusion présentée précédemment avec beaucoup de prudence. La règle des phases de surface de Crisp prédisant que la position du collapse est invariable pour un mélange immiscible est établie en considérant que les deux composés du mélange sont confinés à l'interface. Il se trouve que la protéine peut sélectivement se partager entre l'interface et la sous-phase. La seconde façon de statuer sur l'homogénéité de répartition des deux composés consiste à vérifier si le système obéit ou non à la loi d'additivité des aires moléculaires.

Encore ici, un problème se pose car l'équation 4.6 prévoit que les deux constituants demeurent constamment à l'interface. Nous avons montré que la concentration interfaciale du cytochrome c dépend, notamment, de la pression de surface et de l'histoire du système. Nous tenterons de développer un formalisme permettant de discerner si la présence de la protéine à l'interface lipide-eau est régie par la simple adsorption de la protéine (le système serait alors vraisemblablement immiscible) ou par l'interaction prenant place entre la protéine et la monocouche lipidique (système miscible).

4.2.2.1 La miscibilité du cytochrome c dans les couches monomoléculaires de PC(18:1). Nous avons présenté les raisons qui rendent impossible l'application de la règle des phases et de la loi d'additivité des aires moléculaires au système PC(18:1)-cyt c. Ces deux traitements visent à déterminer la miscibilité du mélange formé à l'interface. Nous avons déjà une raison de croire qu'une interaction se produit entre les deux composés. En effet, lorsque le cytochrome c constitue un film pur, il se désorbe à 8 mN m^{-1} , alors que cette valeur passe à 14 mN m^{-1} dans le cas du système mixte PC(18:1)-cyt c. La différence entre ces deux limites d'éjection constitue une première preuve de la stabilisation du cyt c dans la monocouche de PC(18:1); si le système était immiscible, la pression extérieure exercée par le film de PC(18:1) sur les îlots dispersés de cyt c serait suffisante pour provoquer, au-delà de 8 mN m^{-1} , l'éjection de la protéine. De plus, des études de microscopie électronique de systèmes lipide-protéine mixtes tendent à montrer que la miscibilité des mélanges lipide-protéine est régie par la nature de l'état physique du lipide (Cornell et Carroll (1983; 1985). Ces auteurs rapportent

que les mélanges lipide-protéine sont immiscibles lorsque le lipide présente un état condensé, alors que la miscibilité est parfaite pour les lipides expansés tel la PC(18:1). Est-il possible de tirer des conclusions supplémentaires concernant la miscibilité du mélange PC(18:1)-cyt c ?

Les équations 4.2 et 4.3 décrivent le moment dipolaire d'un film mixte lipide-protéine comme la somme du μ_L du lipide seul et du μ_P de la protéine. Ainsi, si nous déterminons à un Π donné la différence entre le μ_L du système lipide-protéine (μ_{LP}^Π) et du lipide seul (μ_L^Π), nous obtenons le $\Delta\mu_L$ provenant de la contribution de la protéine. Conformément aux équations précédemment établies, la différence $\Delta\mu_{LP-L}^\Pi = \mu_{LP}^\Pi - \mu_L^\Pi$ sera reliée au μ_L par équivalent-résidu et au nombre de résidus par:

$$\Delta\mu_{LP-L}^\Pi = \mu_{LP}^\Pi - \mu_L^\Pi = n_r^\Pi \mu_{Lr}^\Pi \quad (4.7)$$

La Figure 40 présente la différence des moments dipolaires $\Delta\mu_{LP-L}^\Pi$ en conformité avec l'Eq. 4.7, en fonction de la pression de surface d'un film PC(18:1)-cyt c soumis à un cycle compression. Nous avons également inclus la courbe $\mu_L-\Pi$ obtenue pour un film de cyt c pur. De cette figure, il est évident que la solubilisation de la protéine dans la sous-phase se fait à des pressions différentes en fonction de la nature de l'interface. Ce résultat suggère la miscibilité du film.

Nous avons mentionné que la loi d'additivité peut également permettre de statuer en ce qui concerne la miscibilité du mélange. Nous avons exposé les raisons qui rendent ce principe inapplicable aux monocouches mixtes lipide-

protéine. Il s'avère cependant qu'il serait utile de déterminer l'énergie libre de stabilisation du cytochrome c dans une monocouche de PC(18:1).

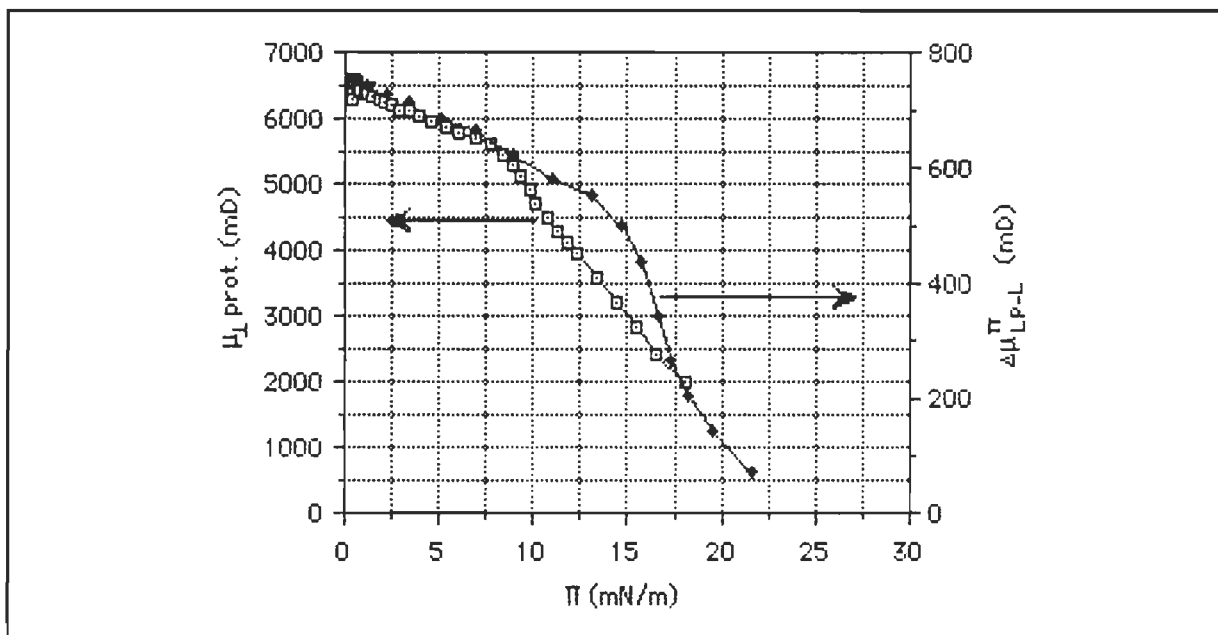


Figure 40. Comparaison entre l'isotherme μ_{\perp} - Π du cytochrome c adsorbé à l'interface air-eau ($\mu_{\perp \text{prot}}$) et celui incorporé dans une monocouche de PC(18:1), $\Delta\mu_{\perp P-L}$. Les moments dipolaires perpendiculaires sont donnés pour divers états de compression des films.

Il est possible pour des monocouches mixtes constituées de composés présents exclusivement à l'interface air-eau de mesurer l'énergie libre en excès résultant de l'interaction entre les deux composés. Cette mesure, $\Delta G_{\text{mél}}^{\Pi}$, représente la différence d'énergie libre existant dans l'interaction des constituants 1 et 2 par rapport aux interactions homogènes du type 1-1 et 2-2. Il est important de comprendre qu'une valeur de $\Delta G_{\text{mél}}^{\Pi}$ nulle ne signifie pas qu'il n'y a pas d'interaction entre les deux constituants, mais bien que les interactions du type 1-2 ne sont pas différentes des interactions homogènes.

L'énergie libre de mélange en excès, $\Delta G_{\text{mél}}^{\Pi}$, est définie comme l'intégrale de zéro à Π de la différence entre l'aire mesurée pour le mélange (σ_{12}) et la moyenne pondérée de l'aire des deux composés purs. Plus pratiquement, cette relation s'exprime:

$$\Delta G_{\text{mél}}^{\Pi} = \int_0^{\Pi} (\sigma_{12} - \chi_1 \sigma_1 - \chi_2 \sigma_2) d\Pi \quad (4.8)$$

où χ_1 et χ_2 sont les fractions molaires du composé 1 et 2, σ_1 et σ_2 les aires moléculaires des composés 1 et 2 à la pression Π . Tout comme la règle des phases de surface de Crisp, cette relation est valable dans la mesure où les composés ne sont présents qu'à l'interface. Comment découler un formalisme applicable à l'incorporation réversible d'un constituant pouvant sélectivement se partager entre la sous-phase et la monocouche?

Le système que nous avons considéré est illustré à la Fig. 41. La section (A) présente le travail qui doit être effectué afin de comprimer un lipide depuis une pression de surface Π_{min} jusqu'à une valeur Π_{max} ($\Delta G_{\text{comp L}}^{\Pi_{\text{min}} \rightarrow \Pi_{\text{max}}}$). Comme aucun effet d'hystérèse n'est observé lorsqu'un film de PC(18:1) est soumis à des cycles compression-expansion ayant une pression maximale inférieure au collapse, nous pouvons écrire :

$$\Delta G_{\text{comp L}}^{\Pi_{\text{min}} \rightarrow \Pi_{\text{max}}} = -\Delta G_{\text{exp L}}^{\Pi_{\text{max}} \rightarrow \Pi_{\text{min}}} = \int_{\Pi_{\text{min}}}^{\Pi_{\text{max}}} \sigma_L d\Pi \quad (4.9)$$

où σ_L est l'aire du lipide considérée à une pression Π . Le travail de compression étant l'inverse du travail d'expansion ($\Delta G_{\text{exp L}}^{\Pi_{\text{max}} \rightarrow \Pi_{\text{min}}}$), le

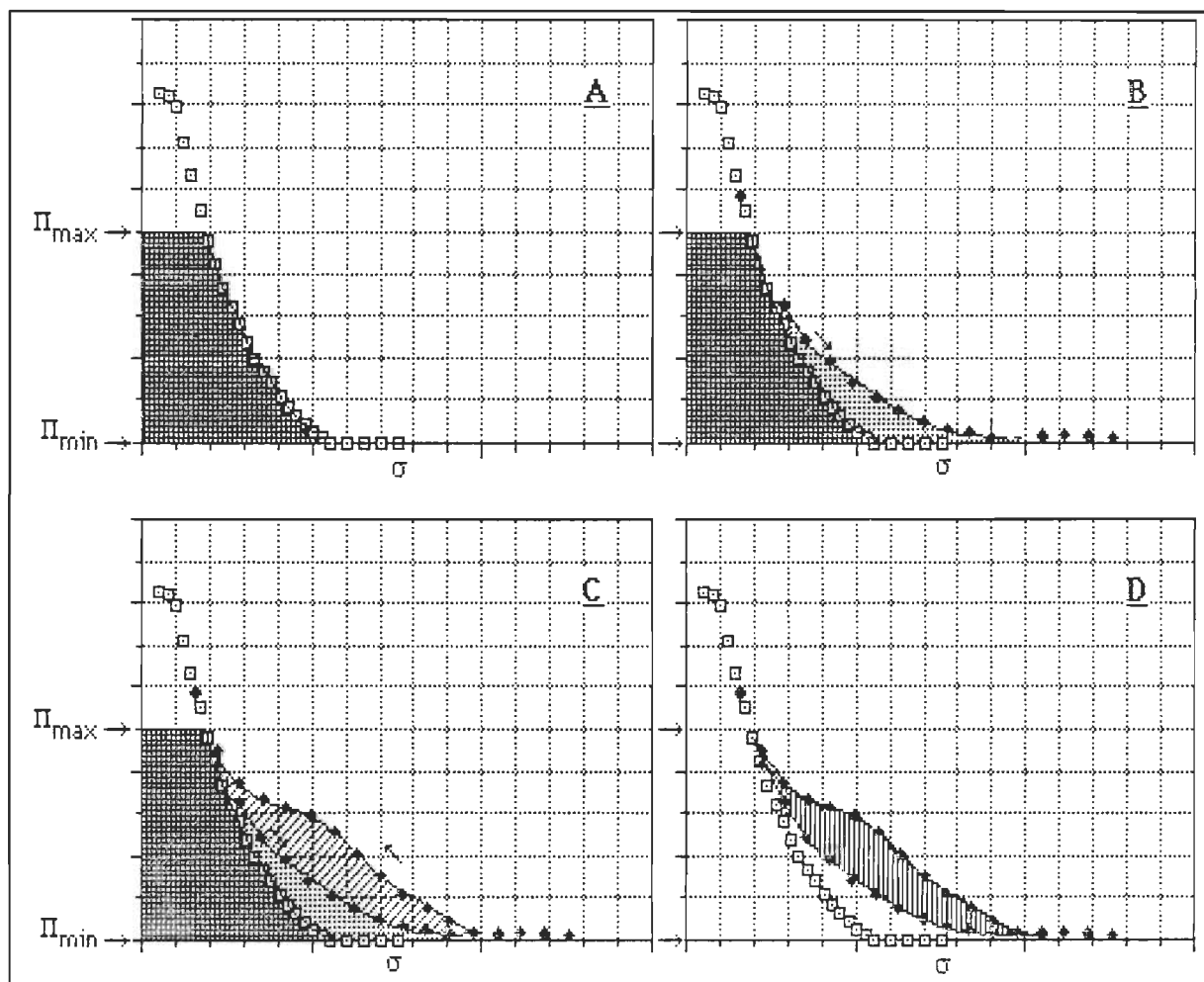


Figure 41. Représentation schématique des diverses phases d'incorporation d'une protéine dans une monocouche lipidique et de la correspondance du travail requis. La première phase consiste à comprimer le lipide de 0 à Π mN m⁻¹(A). Les phases d'expansion et de compression du film lipide-protéine sont présentées en (B) et (C). La différence d'énergie entre les deux aires correspond à l'énergie de stabilisation de la protéine dans la couche lipidique (D).

signe inverse du travail d'expansion provient de la convention de signe établie de telle sorte qu'en expansion l'incrément $d\Pi$ est négatif. Pour le système mixte soumis à une expansion, le travail fourni par le système ($\Delta G_{\text{exp LP}} \Pi_{\max \rightarrow \Pi_{\min}}$) est composé de deux contributions: le travail d'expansion du lipide et le travail d'incorporation de la protéine ($\Delta G_i \Pi_{\max \rightarrow \Pi_{\min}}$). Ainsi:

$$\Delta G_{\text{exp LP}}^{\Pi_{\text{max}} \rightarrow \Pi_{\text{min}}} = \Delta G_{\text{exp L}}^{\Pi_{\text{max}} \rightarrow \Pi_{\text{min}}} + \Delta G_{\text{i P}}^{\Pi_{\text{max}} \rightarrow \Pi_{\text{min}}} - \int_{\Pi_{\text{max}}}^{\Pi_{\text{min}}} \sigma_{\text{exp LP}} d\Pi \quad (4.10)$$

alors que $\sigma_{\text{exp LP}}$ est l'aire du système lipide-protéine lors de l'expansion. Le cycle est complété alors que la compression du système mixte est effectuée. Pour cette opération, le travail de compression du système lipide-protéine ($\Delta G_{\text{comp LP}}^{\Pi_{\text{min}} \rightarrow \Pi_{\text{max}}}$) comporte d'une part le travail de compression du lipide et d'autre part le travail d'éjection de la protéine ($\Delta G_{\text{é P}}^{\Pi_{\text{min}} \rightarrow \Pi_{\text{max}}}$). Nous pouvons écrire:

$$\Delta G_{\text{comp LP}}^{\Pi_{\text{min}} \rightarrow \Pi_{\text{max}}} = \Delta G_{\text{comp L}}^{\Pi_{\text{min}} \rightarrow \Pi_{\text{max}}} + \Delta G_{\text{é P}}^{\Pi_{\text{min}} \rightarrow \Pi_{\text{max}}} = \int_{\Pi_{\text{min}}}^{\Pi_{\text{max}}} \sigma_{\text{comp LP}} d\Pi \quad (4.11)$$

où $\sigma_{\text{comp LP}}$ est l'aire moléculaire mesurée pour le système lipide-protéine lors de la compression. Lors d'un cycle expansion-compression qui possède pour origine et arrivée une même valeur de Π_{max} , le travail d'expansion et de compression du lipide s'annule. Ainsi, le travail utilisé afin de compléter le cycle correspond à la différence d'énergie entre les formes incorporée et solubilisée de la protéine. Ce travail, qui correspond à l'énergie de stabilisation de la protéine dans le film ($\Delta G_{\text{sta P}}$), est donné pour un cycle complet incorporation-éjection par:

$$\Delta G_{\text{sta P}} = \Delta G_{\text{é P}}^{\Pi_{\text{min}} \rightarrow \Pi_{\text{max}}} + \Delta G_{\text{i P}}^{\Pi_{\text{min}} \rightarrow \Pi_{\text{max}}} - \int_{\Pi_{\text{min}}}^{\Pi_{\text{max}}} (\sigma_{\text{comp LP}} - \sigma_{\text{exp LP}}) d\Pi \quad (4.12)$$

Cette procédure permet donc de mesurer la différence d'énergie entre les formes adsorbée et solubilisée de la protéine en considérant les cycles incorporation-éjection complets. Ce formalisme ne prévoit pas de pondération pour la fraction de protéine incorporée dans le film. C'est simplement que l'énergie d'excès mesurée sera proportionnelle à la quantité de protéine incorporée et, comme nous l'avons vu, cette valeur dépend de la pression minimale du cycle. Nous avons mesuré l'aire présentée à la Figure 41(D) pour l'ensemble des expériences expansion-compression menées avec le système PC(18:1)-cyt c. Ce tableau regroupe les résultats obtenus pour 36 cycles compression-expansion ayant 30 mN m^{-1} comme $\Pi \text{ max}$ et des $\Pi \text{ min}$ variant entre 21 et 0 mN m^{-1} . Le choix de 30 mN m^{-1} comme pression maximale nous assure qu'à la fin du cycle, la totalité de la protéine est présente dans sa forme solubilisée.

La Figure 42 présente la relation existant entre l'énergie de stabilisation et le nombre de résidus associés par lipide. La pente de cette relation linéaire est de $250 \text{ J mol lipide (mol éq.résidus)}^{-1}$. Une énergie de cette amplitude ne dépeint sûrement pas une interaction forte. Parmi les interactions faibles gouvernant la structure des molécules biologiques, l'énergie hydrophobe est d'importance. Cette énergie résultant de la maximisation des contacts entre les groupements hydrophobes est un des principes moteurs de l'insertion des protéines membranaires dans la matrice lipidique. Indépendamment de la nature des groupements non-polaires, cette énergie est estimée à 105 J mol^{-1} pour chaque \AA^2 transféré d'un milieu polaire à un milieu non-polaire (Reynolds et coll. (1974); Chothia (1974)). Si l'énergie que nous venons de

rapporter correspond à la stabilisation d'un résidu par effet hydrophobe, nous pouvons estimer qu'en moyenne chaque résidu n'expose que quelques Å² de sa structure (en fait 1% de la surface). De plus, ces valeurs sont maximales car les valeurs estimées pour l'isotherme de référence du cyt c sont possiblement sous-évaluées.

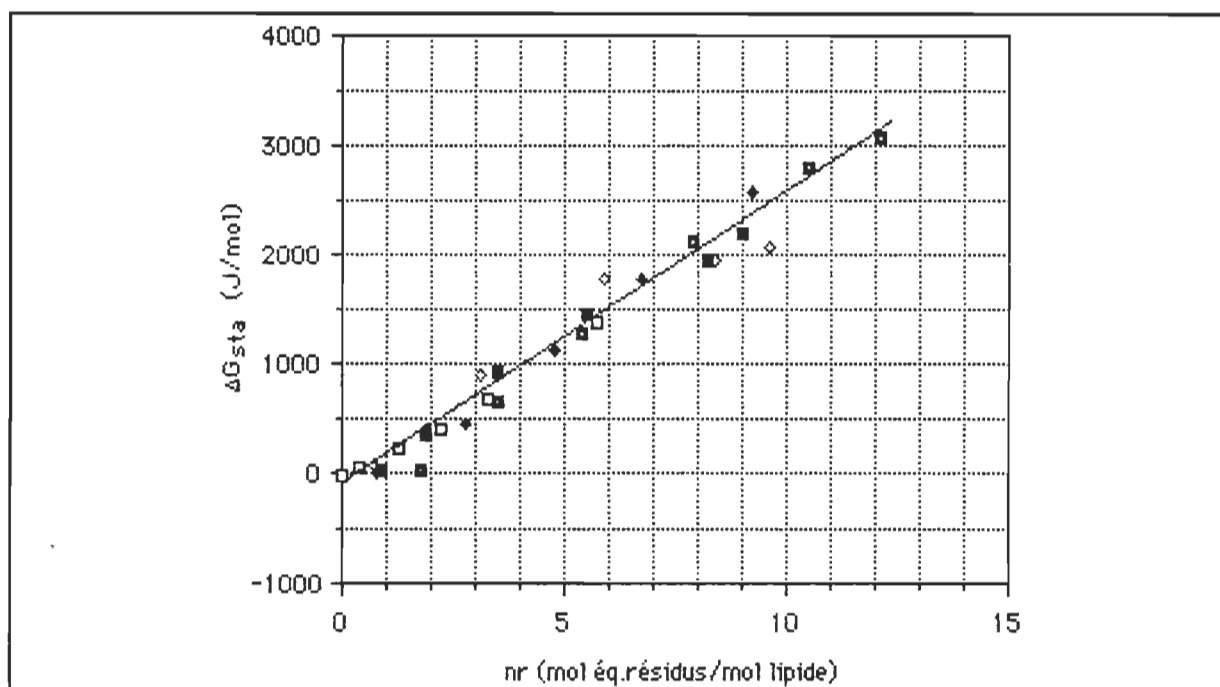


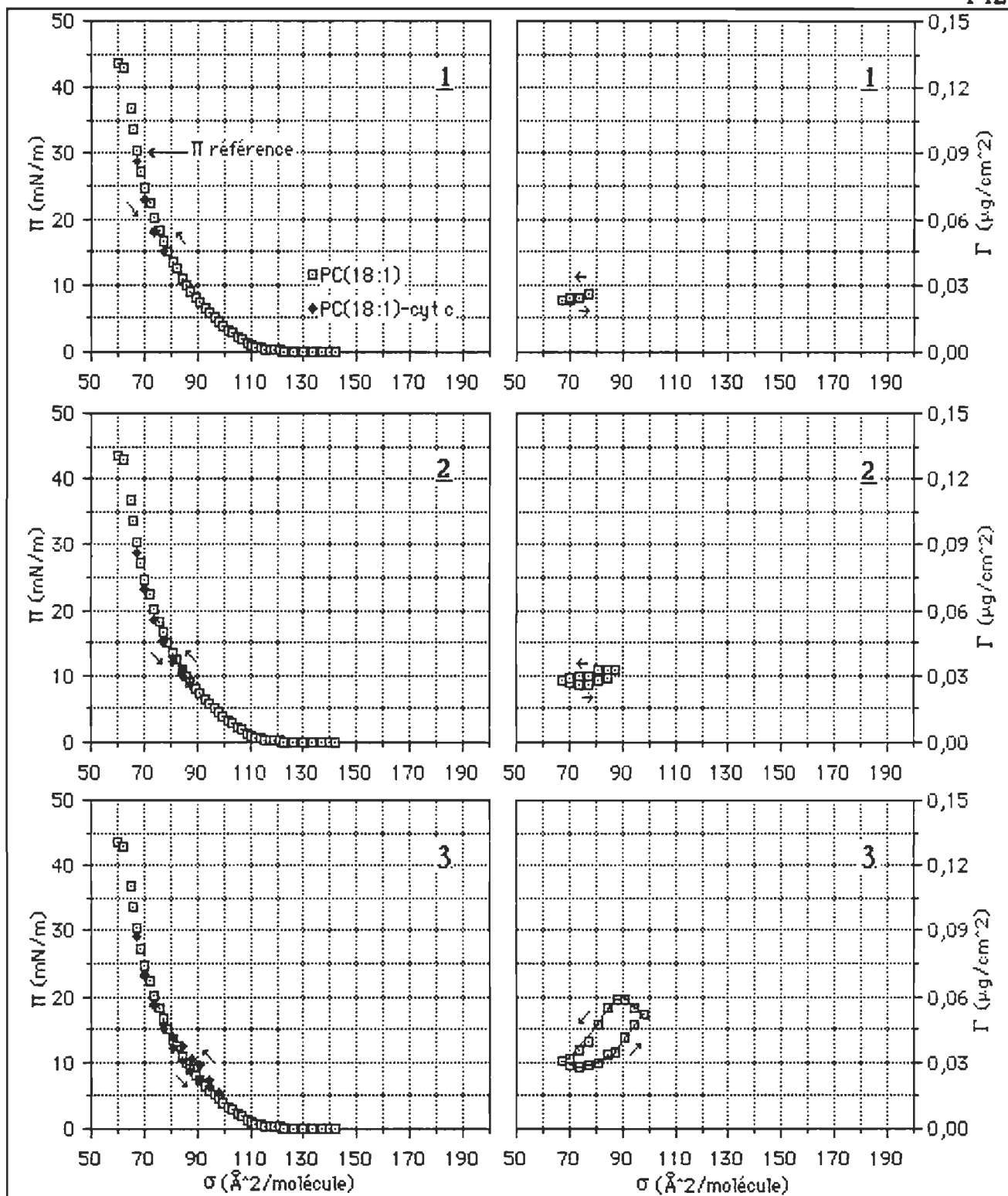
Figure 42. Relation existant entre l'énergie libre de stabilisation du cytochrome c incorporé dans une monocouche de PC(18:1) et le nombre d'équivalents-résidus associés par lipide. La pente de la relation est de 250 J mol lipide (mol. éq. résidus)⁻¹.

4.2.2.2 Confrontation des concentrations interfaciales de protéine estimées par différence des isothermes Π - σ et par radioactivité de surface.

Nous avons rapporté une façon d'estimer la concentration interfaciale du cytochrome c en comparant, à pression de surface fixe, les aires obtenues pour le lipide seul et le système mixte lipide-protéine. Afin de quantifier cette concentration, nous avons recours à l'isotherme Π - σ obtenue pour un film de

protéine. L'incertitude que nous avons sur la détermination de la concentration interfaciale par cette méthode provient du fait que nous ne pouvons être certain que tout le matériel demeure à l'interface lors de la fabrication du film protéique. Ainsi, une sous-estimation de l'aire moléculaire réelle de la protéine entraîne une surestimation de la concentration interfaciale de protéine. Après calibration du détecteur de radioactivité, il est possible de déterminer la concentration interfaciale du [^{14}C] cytochrome c dont l'activité spécifique est connue. Nous avons entrepris de comparer les concentrations interfaciales déterminées par les deux méthodes.

La Figure 43 présente les isothermes Π - σ et Γ - σ obtenues pour le système PC(18:1)-[^{14}C] cyt c soumis à six cycles expansion-compression originant de $\Pi=30 \text{ mN m}^{-1}$. Ces résultats donnent une confirmation directe de l'incorporation réversible du cytochrome c dans une monocouche de PC(18:1). Comme nous l'avons précédemment précisé, l'incorporation de la protéine est régie par la pression de surface. En décompression, lorsque la pression de surface est abaissée en deçà de 20 mN m^{-1} , la protéine s'incorpore dans le film. Lorsque suite à l'expansion une compression est accomplie, la concentration interfaciale de la protéine augmente, jusqu'à un point où elle retombe sur la valeur obtenue à la pression de référence du cycle. Comme il est montré à la Figure 43, plus la pression minimale du cycle est faible, plus la quantité de protéine incorporée est grande. Conséquemment, le cycle d'hystérèse est plus ample.



LES CYCLES 4 A 6 SONT PRESENTES A LA PAGE SUIVANTE

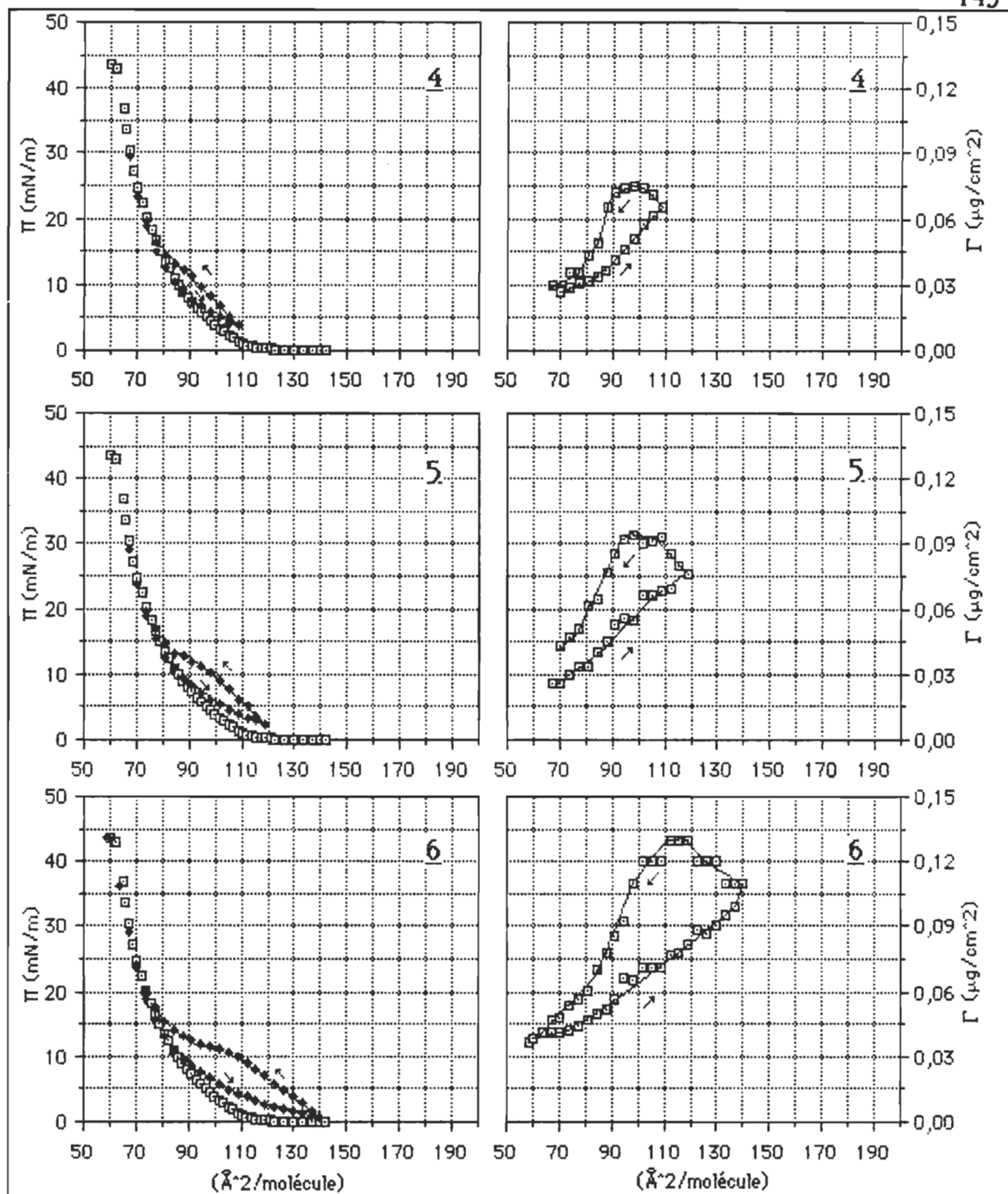


Figure 43. Isothermes Π - σ et Γ - σ obtenues pour la PC(18:1) et pour le système PC(18:1)-[^{14}C] cyt c soumis à six cycles expansion-compression opérés depuis une pression de surface de référence de 30 mN m^{-1} . Le rendement du détecteur de radioactivité était de 21 % et l'activité spécifique du [^{14}C] cytochrome c de $4,3 \mu\text{Ci mmol}^{-1}$. Sous-phase: Tampon Tris-HCl 10^{-3}M , pH=8,0. [cyt c] = $2,7 \times 10^{-7}\text{M}$.

Même à 30 mN m^{-1} , la concentration de surface du cyt c n'est jamais nulle. La concentration de protéine déterminée à la pression de référence croît de 0,020 à $0,035 \mu\text{g cm}^{-2}$ du cycle 1 au cycle 6. Ce signal provient de la protéine présente dans la couche d'eau voisine de l'interface. Le pouvoir de pénétration du β^- de 0,156 MeV, l'énergie maximale du rayonnement du ^{14}C , est de $300 \mu\text{m}$ dans l'eau (Neame et Homewood (1974)). Ainsi, la protéine présente à moins de $300 \mu\text{m}$ de l'interface contribue à la mesure de radioactivité de surface. Le fait que la radioactivité de base s'accroît au fur et à mesure que les cycles sont opérés dénote un enrichissement de la phase sous-jacente à l'interface. En fait, nous croyons qu'une fois éjectée de la monocouche, la protéine demeure présente sous la couche de lipide dans une phase enrichie en protéine.

Afin de comparer les concentrations interfaciales déterminées par la mesure du Δa et par radioactivité de surface, nous avons retranché de la mesure de radioactivité le seuil de concentration mesuré à la pression de référence (30 mN m^{-1}). Les valeurs de Γ corrigées furent, par la suite, converties en résidus de protéine par lipide, n_f . A la Figure 44, ces valeurs sont comparées avec les valeurs déterminées selon l'Eq. 4.3. Il apparaît que les valeurs mesurées par radioactivité sont en accord avec les valeurs déterminées par comparaison des isothermes $\Pi-\sigma$ à $\pm 0,5$ résidu lipide $^{-1}$. Ce résultat permet de conclure que l'isotherme référentielle du cytochrome c présente des aires moléculaires proches des valeurs réelles.

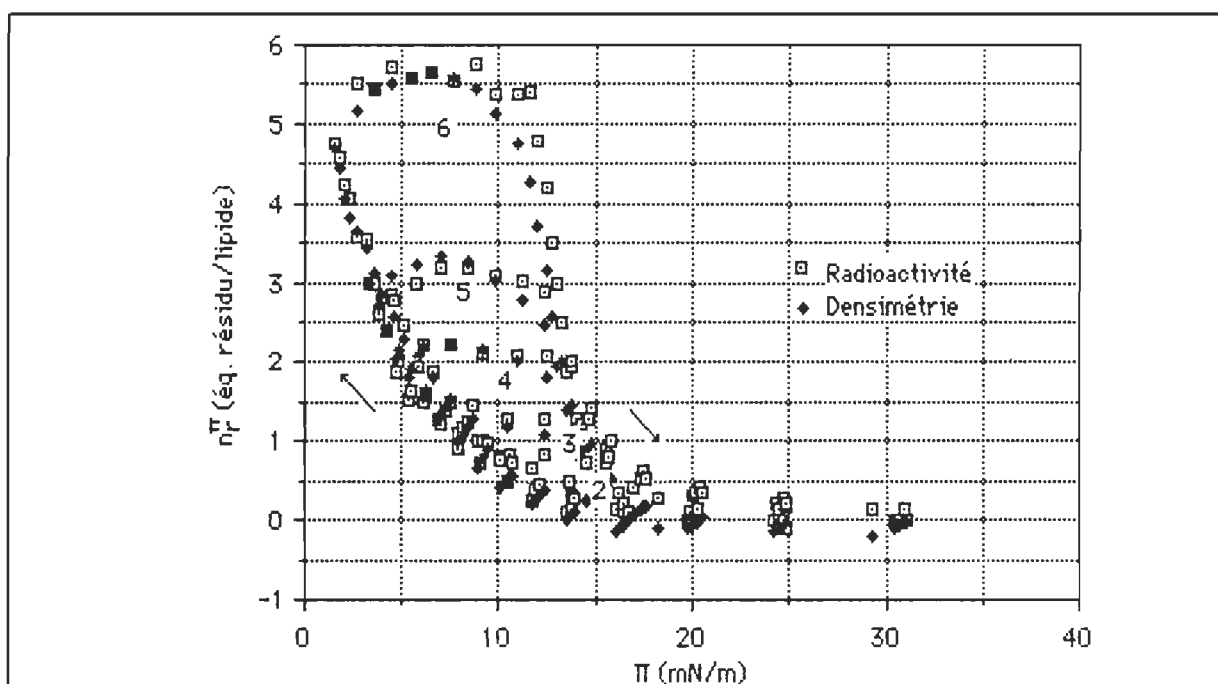


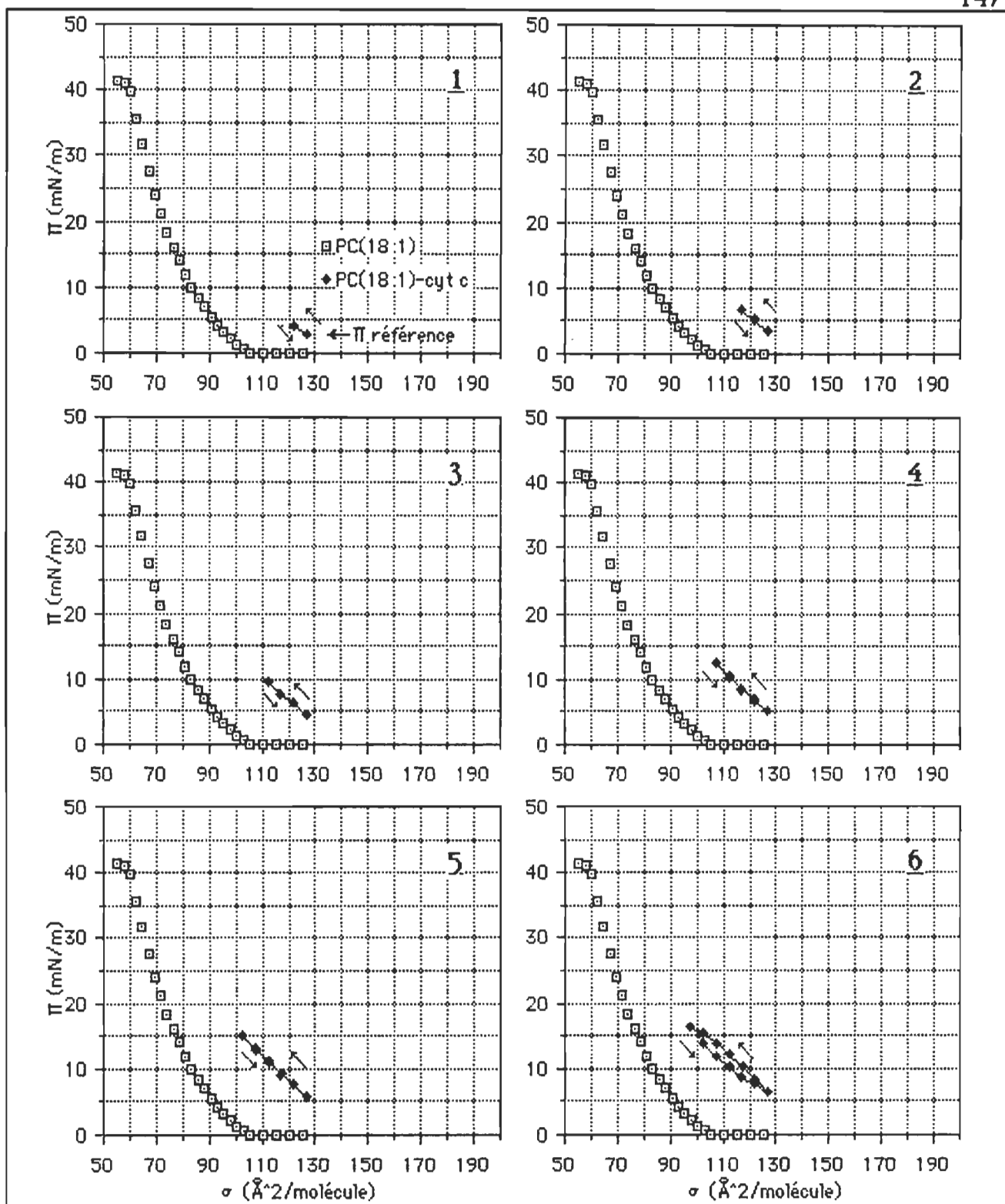
Figure 44. Comparaison des valeurs de Π_r^Π déterminées par mesure de radioactivité (Radioactivité) et par comparaison des isothermes Π - σ obtenues pour le lipide et le mélange lipide-protéine (Densimétrie). Cette comparaison est faite pour la série de cycles expansion-compression originant de 30 mN m^{-1} présentée à la Fig. 43. Les valeurs déterminées par radioactivité furent corrigées en retranchant le niveau de base mesuré pour le film comprimé à 30 mN m^{-1} .

Une différence entre les isothermes expansion-compression rapportées pour les systèmes PC(18:1)-cyt c et PC(18:1)-[^{14}C] cyt c est cependant notée. Dans le cas du système PC(18:1)-cyt c, nous avons déterminé que le cytochrome c est éjecté de la couche lipidique alors que $\Pi \geq 14 \text{ mN m}^{-1}$. Dans le cas où nous utilisons la protéine marquée, cette pression d'éjection est abaissée à 12 mN m^{-1} . Cette différence peut être imputable à la modification chimique subie par la protéine lors de son marquage.

4.2.3 Les cycles compression-expansion multiples opérés depuis faible pression de surface. Le comportement interfacial du cytochrome c soumis à des cycles compression-expansion-compression est différent si ces cycles sont amorcés depuis faible ou forte pression de surface. Alors que les cycles sont

opérés depuis une faible pression de surface, la pression à laquelle le cytochrome c est exclu de l'interface augmente. Cet effet peut être la cause d'un enrichissement de l'interface en résidus hydrophobes ou d'une modification chimique ou physique de la protéine adsorbée. Plus couramment, le second processus est dénommé dénaturation de surface des protéines. Ce processus, lorsqu'il est effectif, se produit aux faibles pressions de surface. Nous avons voulu vérifier si l'influence de la pression de surface de référence se manifeste également pour les systèmes mixtes PC(18:1)-cyt c.

Les isothermes Π - σ présentées à la Figure 45 ont été obtenues alors qu'un système mixte PC(18:1)-cyt c fut soumis à dix cycles compression-expansion originant de faible pression de surface. A cause de l'incorporation continue de protéine à l'interface, la pression de référence n'a pu être maintenue constante. Des cycles 1 à 10, elle passe de 3,0 à 7,2 mN m⁻¹. La seule déviation est notée au dernier cycle (cycle 10) alors que la pression de référence est moindre que celle du cycle précédent. Probablement qu'à ce point, l'adsorption du cyt c dans le compartiment de référence commence à être non-négligeable. Nous estimons que les pressions de surface rapportées pour le dixième cycle sont sous-évaluées d'environ 1 mN m⁻¹. Pour cette raison, les cycles furent stoppés. Nous pouvons remarquer que l'effet d'hystérèse traduisant l'incorporation-éjection réversible de la protéine n'est pas noté avant qu'une pression de 15 mN m⁻¹ soit atteinte en compression. En deçà de cette limite, le travail fourni au système ne sert qu'à comprimer le film mixte. Au-delà de cette limite, l'apparition de l'hystérèse dénote qu'une partie du travail sert à désorber la protéine du film. Si, pour les cycles amorcés à forte pression, la



LES CYCLES 6 A 10 SONT PRESENTES A LA PROCHAINE PAGE

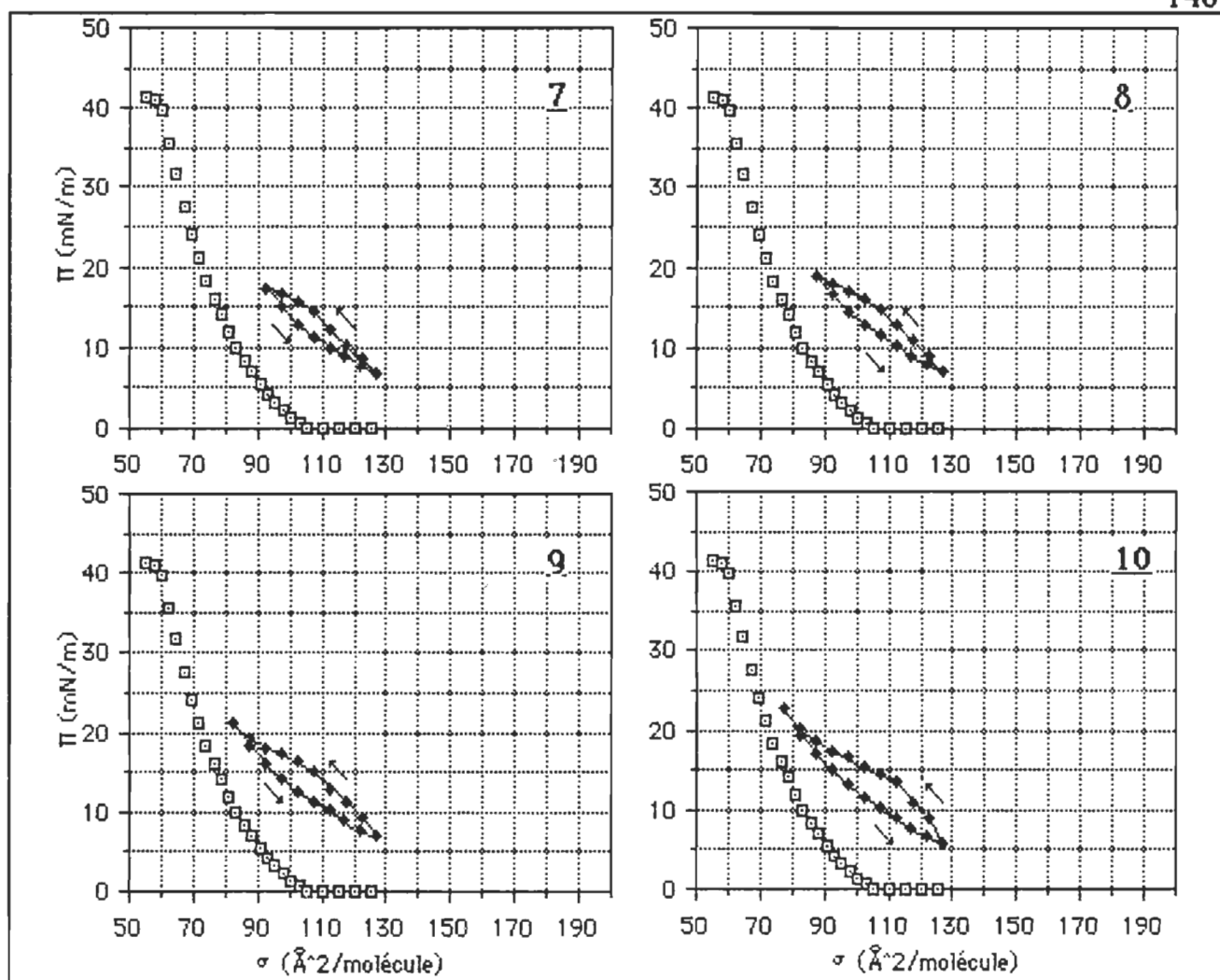
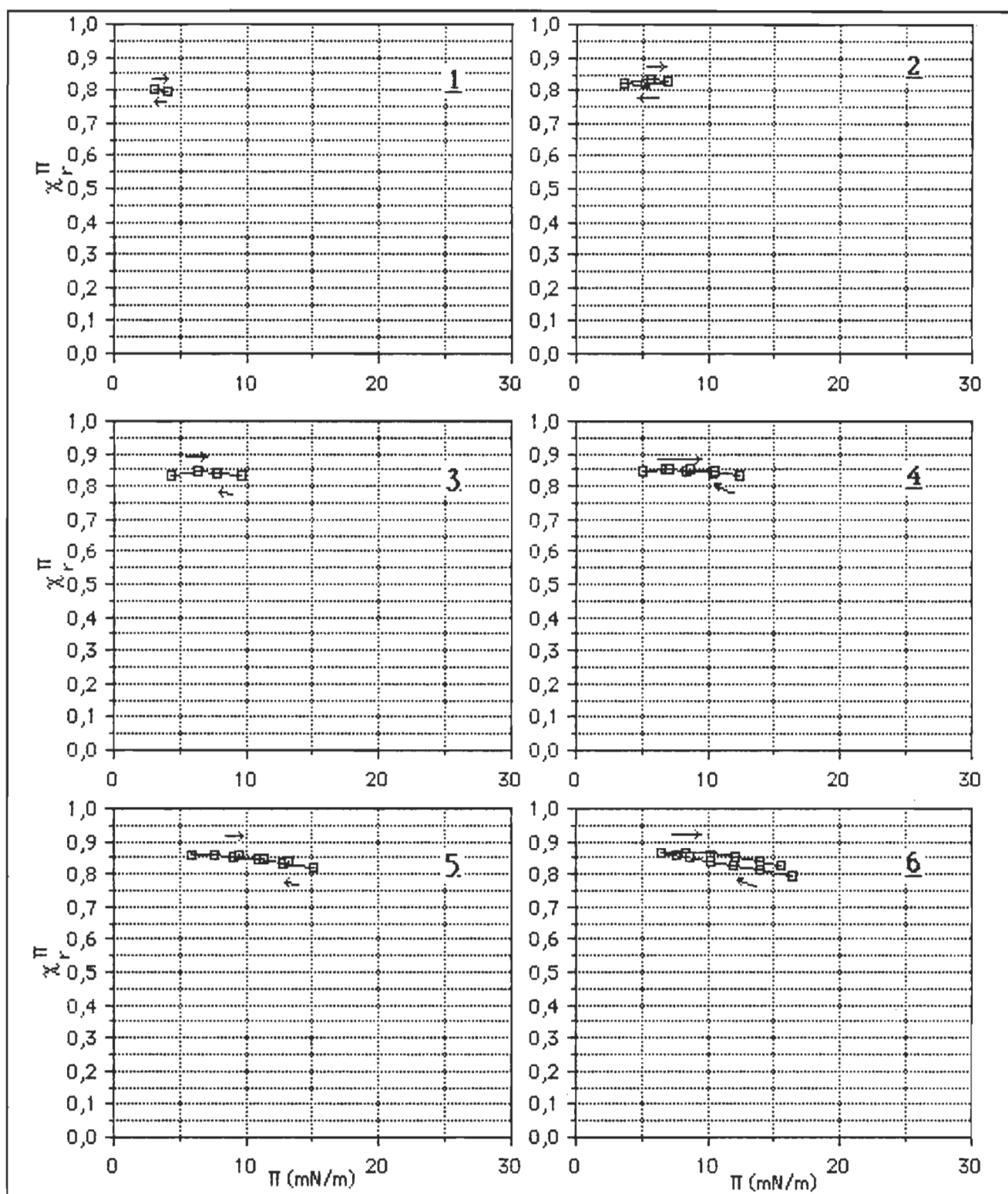


Figure 45. Isothermes Π - σ obtenues pour la PC(18:1) et pour le système mixte PC(18:1)-cytochrome c soumis à 10 cycles compression-expansion opérés depuis faible pression de surface. Les limites supérieures de compression des cycles 1 à 10 sont respectivement 4,0; 6,8; 9,6; 12,4; 15,1; 16,4; 17,5; 19,0; 21,0 et 22,6 mN m⁻¹. Sous-phase: Tampon Tris-HCl 10⁻³M, pH-8,0. Température: 20 ± 1°C. [cyt c] = 2,3 x 10⁻⁷ M.

totalité de la protéine est éjectée au-delà de 23 mN m^{-1} , il en est autrement ici. Il est possible de constater à la Figure 46 que la fraction molaire résiduelle demeure importante, même lorsque le film est comprimé à $22,6 \text{ mN m}^{-1}$. De plus, l'ampleur des hystérèses est moindre que ce qui fut rapporté pour les cycles originant d'un Π référentiel de 30 mN m^{-1} (voir la Fig. 39). Ce comportement des films comprimés depuis un faible Π de référence suggère qu'une fraction de la protéine est plus fortement ancrée, voire immobilisée à l'interface. Tout comme pour les films composés uniquement de cyt c, ce comportement peut refléter un repartitionnement de la protéine à l'interface ou sa dénaturation.

Les moments dipolaires de surface mesurés et calculés, en conformité avec les Eqs. 4.2 et 4.3, sont comparés à la Figure 47. Les valeurs mesurées sont légèrement supérieures aux valeurs calculées pour les quatre premiers cycles. A compter du moment où l'hystérèse se fait importante, il existe un bon accord entre les valeurs mesurées et calculées. Cet accord est représentatif du fait que le comportement du système binaire peut grossièrement être décrit comme la somme des comportements des corps purs. Cette constatation est en accord avec l'observation que l'énergie d'interaction entre les deux composés est très faible. Il est également notable que même au-dessus de 20 mN m^{-1} , les moments dipolaires du mélange PC(18:1)-cyt c et du lipide pur ne se superposent pas. Même si la différence n'est pas énorme, ce comportement est distinct de celui rapporté à la Fig. 37. La limite inférieure où se produit l'éjection de la protéine est approximativement la même dans les deux cas. La distinction existant entre les cycles opérés depuis faible et forte pression



LES CYCLES 6 A 10 SONT PRESENTES A LA PROCHAINE PAGE

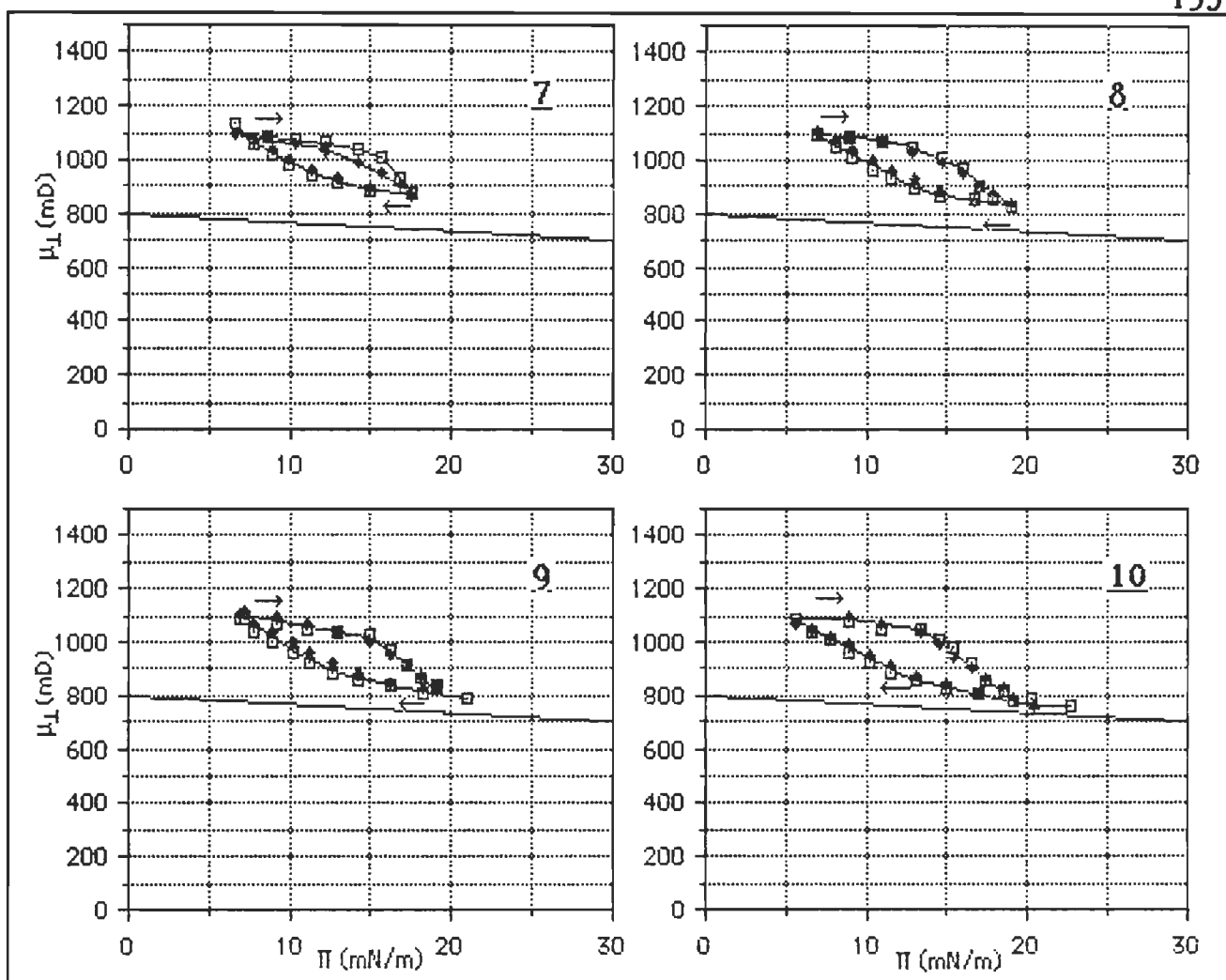


Figure 47. Comparaison entre les moments dipolaires μ_L mesurés et calculés pour les dix cycles compression-expansion rapportés à la Fig. 45. Le moment dipolaire de la PC(18:1) aux diverses pressions de surface est indiqué par la droite.

de surface ne se fait pas sentir au début de l'expulsion mais à la toute fin. Lorsque la protéine est gardée à faible pression de surface, elle demeure plus fortement ancrée à l'interface et à la monocouche lipidique.

Ce comportement distinct du système mixte, qui dépend du fait que le film est gardé à forte ou faible pression de surface, est d'intérêt puisque la majorité des études visant à caractériser l'incorporation des protéines sur les couches lipidiques sont menées à faible pression de surface sur des périodes de quelques heures. Nos résultats indiquent que la réversibilité de l'incorporation est préservée dans le temps alors que le système est laissé à de fortes pressions de surface. Ainsi, nous croyons qu'une altération non-négligeable des propriétés de surface des protéines prend place lorsque l'incorporation d'une protéine est étudiée par les méthodes conventionnelles.

4.3 Conclusion

Le système PC(18:1)-cyt c représente un système binaire dont l'incorporation de la protéine dans la phase lipidique est régie par la pression de surface du film. Autant les mesures de pression, de potentiel que de radioactivité de surface démontrent qu'en décompression, la protéine est graduellement incorporée dans le film à des pressions inférieures à 20 mN m⁻¹; plus la pression de surface est élevée, plus la quantité de protéine incorporée est importante. En recompression, la concentration de protéine, exprimée en protéine/lipide, demeure relativement constante de 0 à 14 mN

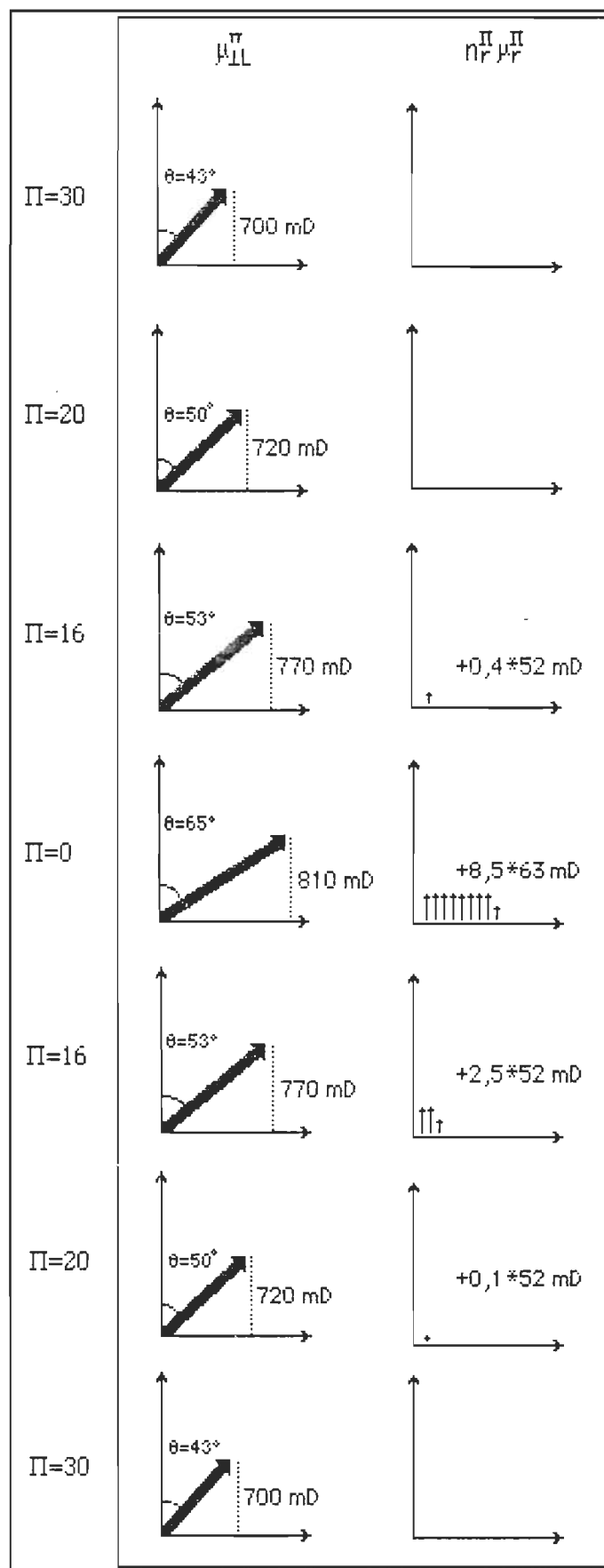
m^{-1} . Au-delà de cette pression, la protéine est graduellement expulsée dans la sous-phase. A 20 mN m^{-1} , la protéine est complètement exclue de l'interface. De légères différences entre les isothermes ellipsométriques du lipide seul et du mélange comprimé au-delà du seuil d'expulsion de la protéine suggèrent que la protéine, une fois éjectée du film, est présente dans une phase adjacente à la monocouche. Cette phase enrichie permet une incorporation de la protéine lors d'une expansion subséquente.

Le fait que la position du point d'éjection de la protéine ne soit pas dépendant de la fraction molaire résiduelle pose le problème de la miscibilité du mélange. Une fois incorporée, la protéine est stabilisée dans le film jusqu'à une pression de 14 mN m^{-1} , mais cette stabilisation est-elle le reflet de l'interaction entre le cyt c et la PC(18:1) ou résulte de la simple tendance que possède le cyt c de s'adsorber à l'interface air-eau ? Déjà, nous devons constater que les pressions limites d'éjection sont différentes pour le cyt c à l'interface air-eau (8 mN m^{-1}) et pour le cyt c à l'interface PC(18:1)-eau (14 mN m^{-1}). Cette différence est également traduite par les isothermes $\mu_1 - \Pi$ et les mesures de radioactivité de surface (à la distinction près que le $[^{14}\text{C}]$ cyt c est exclu du film de PC(18:1) à 12 mN m^{-1}). Le calcul de la différence de travail présentée par le cycle d'hystérèse nous permet de vérifier que l'énergie d'éjection est proportionnelle au nombre d'équivalents-résidus associés par lipide. Cette énergie est estimée à $250 \text{ J mol lipide (mol \acute{e}q. r\acute{e}s\acute{e}dus)^{-1}}$. La procédure utilisée afin d'évaluer l'énergie de stabilisation est inédite et peut être appliquée à d'autres systèmes qui présentent une incorporation réversible d'une protéine dans une monocouche lipidique. Une telle

incorporation régularisée par la pression de surface est rapportée pour les systèmes PC (16:0)-albumine sérique (Taneva et coll. (1984)) et dilauroyl-phosphatidylglycérol-cardiotoxine IV (Bougis et coll. (1987)). Ces résultats démontrent que même si l'énergie de stabilisation est faible, le mélange PC(18:1)-cyt c est miscible entre 0 et 23 mN m⁻¹.

L'interaction hydrophobe est le principe moteur de l'incorporation des protéines dans les membranes (Jähnig (1983)). Cette énergie de contact est évaluée à 105 J mol⁻¹ Å⁻². En considérant l'énergie de stabilisation pour la totalité d'une protéine, nous trouvons qu'en terme d'énergie hydrophobe ce processus correspond à l'enfouissement d'une surface de 250 Å² par protéine. A quoi peuvent correspondre 250 Å² dans une structure aussi complexe que celle du cytochrome c ? Sans statuer sur la spécificité fonctionnelle de l'interaction entre le cyt c et la phase lipidique, nous ferons deux comparaisons. La surface du groupement hème compris dans le cytochrome c est légèrement supérieure à 140 Å² molécule⁻¹. L'enfouissement de ce groupement correspond donc au transfert d'une surface supérieure à 280 Å². En étudiant l'incorporation des protéines dans les membranes, il est courant de considérer l'incorporation des hélices- α dans les couches lipidiques (Kennedy (1978); Jähnig (1983)). En considérant un rayon de 2,5 Å, une hélice α doit avoir une longueur de 12 Å afin de présenter une surface de 250 Å². Ces deux comparaisons visent à montrer qu'il est raisonnable de penser que l'énergie hydrophobe soit responsable de l'incorporation du cytochrome c dans une couche monomoléculaire de PC(18:1).

Nous avons utilisé un formalisme permettant d'exprimer le moment dipolaire perpendiculaire du mélange lipide-protéine comme la somme linéaire de la contribution du lipide et de la valeur de la protéine pondérée pour sa fraction molaire. Cette approche suppose que l'orientation du lipide et de la protéine est, pour l'ensemble des pressions de surface, la même que celle retrouvée dans des films constitués des corps purs. Cependant, une particularité fut observée. Pour l'ensemble des cycles lorsqu'il y a incorporation de protéine, l'accord entre les valeurs mesurées et calculées est excellent pour l'expansion, alors que pour la compression, les valeurs mesurées sont supérieures d'environ 50 mD aux valeurs calculées. Quoique cet écart est de l'ordre de grandeur de l'erreur expérimentale, sa présence uniquement lors de l'expansion, de même que son indépendance avec la concentration de cyt c pose un problème. Une représentation schématique de la contribution de la protéine et du lipide au μ_{\perp} total est donnée à la Figure 48. Nous avons également inclus sur cette figure l'inclinaison moyenne que le lipide présente par rapport à l'axe z. Ces valeurs furent déterminées par simulation de l'isotherme ellipsométrique de la PC(18:1) (Ducharme (1987)). D'une part, nous pouvons constater que le moment dipolaire mesuré pour les divers états de compression du lipide n'est pas la simple contribution de la projection du moment dipolaire global sur l'axe z. Ainsi, si nous considérons le μ_{\perp} comme étant la seule contribution du moment dipolaire moléculaire, ce dernier serait de 960 mD à 30 mN m⁻¹, alors qu'il serait de 1920 mD à 0 mN m⁻¹. Il est certain que le changement du potentiel de référence, causé par l'interaction entre les molécules d'eau adjacente au film et les molécules de lipide, contribue de façon non-négligeable au potentiel de surface. Si la différence entre les



↑
 E
X
P
A
N
S
I
O
N
 ↓
 C
O
M
P
R
E
S
S
I
O
N
 ↓

Figure 48. Représentation schématique des deux composantes qui contribuent au moment dipolaire total du système binaire PC(18:1)-cyt c soumis à divers états de compression. Les angles indiqués sont les angles déterminés par ellipsométrie de surface (Ducharme (1987)). Le moment dipolaire total du lipide ($\mu_L / \cos \theta$) n'est pas constant pour les diverses inclinaisons indiquant que le potentiel de surface n'est pas la simple contribution du moment dipolaire du lipide se réorientant suite à la compression.

μ_1 mesurés et calculés est provoquée par une influence de la protéine sur le lipide, cet effet doit être croissant avec l'augmentation du nombre de résidus associés par lipide. Or il s'avère que, pour la phase compression des cycles 3 à 6 présentés à la Figure 37, l'écart entre les μ_1 mesurés et estimés est constant à environ 50 mD, alors la concentration résiduelle maximale passe de 3 à 6,8 éq.résidus lipide⁻¹. Ce comportement peut refléter que lorsqu'il y a incorporation de la protéine, les μ_1 du lipide et de la protéine sont couplés et ne présentent pas la même valeur à une pression de surface donnée que les corps purs. Le fait que l'amplitude de cet écart ne soit pas affectée par la quantité de protéine associée par lipide pose cependant un problème qui reste à élucider.

La dénaturation de surface est un ancien problème qui est abordé dans de nombreux articles (Neurath et Bull (1938); Bull (1947); Cheesman et Davies (1954); Trurnit (1960)). En voulant définir la dénaturation de surface des protéines, Neurath et Bull (1938) mentionnent que " le terme dénaturation est utilisé afin de dénoter un profond changement structural de la protéine, et implique un changement de la conformation moléculaire d'un état condensé à un état plus relâché". En fait, selon cette définition, à partir du moment où il y a organisation d'une protéine à l'interface air-eau, il y a dénaturation de celle-ci. Ce type d'altération touche principalement la fonctionnalité de la protéine; conséquence directe de la modification des niveaux supérieurs de structure de la protéine. Dans le cas qui nous intéresse, nous avons vu que ladite dénaturation du cyt c adsorbé sur une monocouche de PC(18:1) est un mécanisme réversible. Cependant un processus altérant la réversibilité de la

dénaturation est effectif lorsque le système est laissé à des faibles pressions de surface. Nous croyons que l'apparente irréversibilité de ce second mécanisme convient mieux à l'idée conventionnelle du mécanisme de dénaturation de surface des protéines. Cette modification de la protéine adsorbée peut être causée par une modification chimique (entendre polymérisation) ou un changement structurel du film. Ce dernier mécanisme présente une certaine similitude avec la propriété qu'ont certaines protéines de former des coagulums à l'interface air-eau (Bull (1947)).

CHAPITRE 5

LE SYSTEME BINAIRE CHLOROPHYLLE A-CYTOCHROME C

5.1 Les propriétés interfaciales de la chlorophylle a

Les isothermes Π - σ et ΔV - σ obtenues pour la chlorophylle a déposée à l'interface air-tampon en utilisant le benzène comme solvant d'étalement sont présentées à la Figure 49. La déviation maximale par rapport à l'isotherme moyenne est de $\pm 5 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$. La différence retrouvée pour un ensemble de mesures effectuées à partir d'une même solution-mère est d'au-plus $2 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$. C'est des diverses préparations que provient l'erreur de $\pm 5 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$ observée pour les isothermes Π - σ . La déviation maximale par rapport à l'isotherme moyenne de potentiel de surface est de $\pm 15 \text{ mV}$.

Tout comme la PC(18:1), la chlorophylle a présente le comportement d'un film présent dans un état liquide expansé. De même, le potentiel de surface mesuré avant le point de montée de la pression de surface est instable entre 0 mV et un maximum voisin du potentiel stable mesuré au point de montée. Ce comportement laisse présager que le film est inhomogène dans l'état relâché. Aussitôt le point de montée atteint, le potentiel de surface devient stable. Le film de chl a peut être comprimé à une pression maximale de 28 mN m^{-1} , endroit où est observé le collapse du film. Le processus de collapse est caractérisé par un plafonnement de la pression et du potentiel de surface.

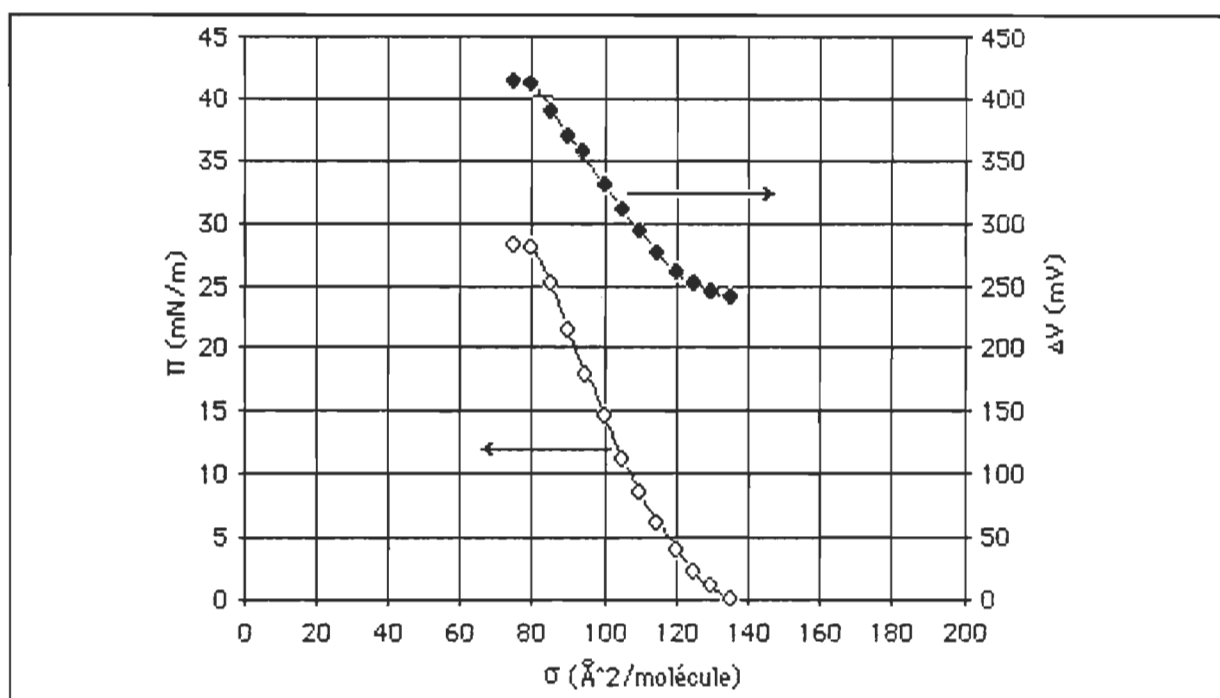


Figure 49. Isothermes Π - σ et ΔV - σ obtenues pour la chlorophylle a étalée à l'interface air-tampon Tris 10^{-3}M , pH-8,0. Les expériences ont été faites sous éclairage vert tamisé. La chlorophylle fut étalée à partir d'une solution de benzène. La température fut maintenue à $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Vitesse de compression de $6 \text{\AA}^2 \text{molécule}^{-1} \text{min}^{-1}$.

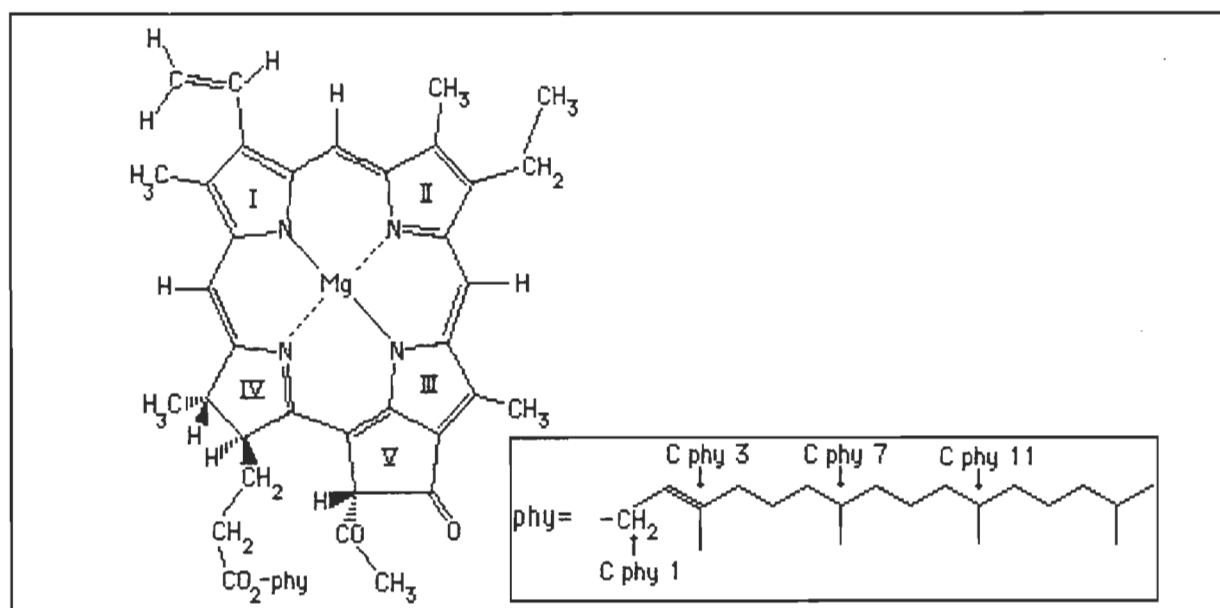


Figure 50. Représentation de la structure chimique de la chlorophylle a. Pour le besoin de l'illustration, la molécule a été scindée en deux parties: l'anneau porphyrinique et la chaîne phytyle (tiré de Katz et coll. (1978))

La structure chimique de la chlorophylle a est présentée à la Figure 50. La surface de l'anneau porphyrique de la chlorophylle a est évaluée, en utilisant un modèle CPK, à plus de 200 \AA^2 molécule⁻¹. Comme le point de montée de Π se situe à 135 \AA^2 molécule⁻¹, il apparaît que dans cet état de compression, l'anneau porphyrique est incliné par rapport au plan de l'interface. Nous présentons à la Figure 51 deux modèles d'organisation proposés pour la chlorophylle a organisée à une interface milieu polaire/milieu apolaire (Brasseur et coll. (1984)). Pour ces deux modèles, les auteurs considèrent que le plan de la tête porphyrique forme un angle de 45° avec le

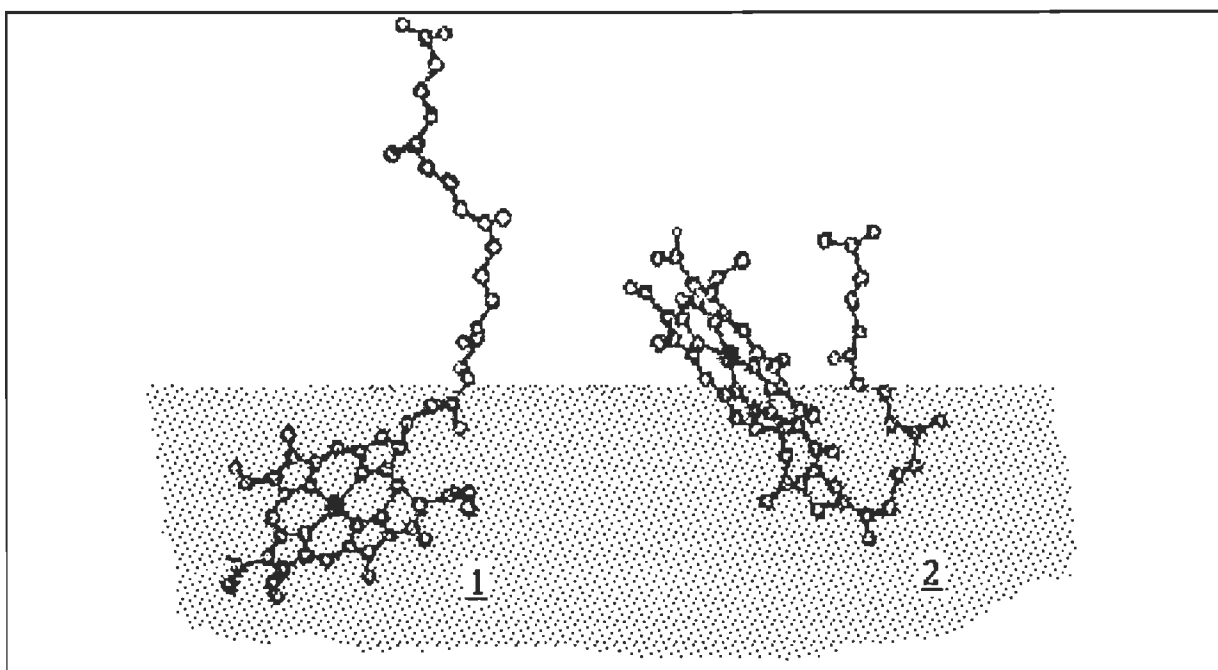


Figure 51. Représentation schématique de l'orientation possible de la molécule de chlorophylle a à l'interface air-eau. Dans le premier modèle, la totalité de l'anneau porphyrique est immergée dans la sous-phase alors que le second modèle permet à celui-ci de se positionner dans le milieu aérien (tiré de Brasseur et coll. (1984)).

plan de l'interface. Nous favorisons le second modèle puisqu'il permet à une portion importante du cycle porphyrique d'interagir avec le milieu apolaire. Ce

faisant, une portion de la queue phytyle se trouve entraînée dans la sous-phase. Il faut cependant garder en mémoire que la portion de la chaîne phytyle présente dans le milieu aqueux, de même que l'anneau V du cycle porphyrrique (Figure 50), comportent des groupements carbonyles et carboxyles hydrophiles. Comme les groupements qui interagissent avec la sous-phase sont essentiellement les mêmes dans les deux cas, la différence énergétique entre ces deux formes repose essentiellement sur la différence d'aire hydrophobe exposée au milieu aqueux. Nous avons grossièrement estimé à l'aide d'un modèle CPK que la forme 2 expose environ 60 Å² de moins de sa portion hydrophobe que la forme 1. Tel que proposé par Chapados et Leblanc (1983), cette configuration offre également la possibilité aux molécules de chlorophylle a de former un réseau bidimensionnel où les anneaux porphyrines sont interreliés par le biais de molécules d'eau.

Tableau 5

Comparaison des aires moléculaires de la chlorophylle a dans divers états de compression

Pression de surface (Π , mN m ⁻¹)		Aire moléculaire (σ , Å ² molécule ⁻¹)			
0	135	138	137	140	135
5	116	119	123	121	120
10	104	108	113	110	107
15	96	100	102	102	100
20	90	94	98	97	92
25	84	86	92	91	85
Référence	(1)	(2)	(3)	(4)	(ce travail)
Sous-phase	tampon PO ₄	tampon PO ₄	eau	tampon PO ₄	tampon Tris
Température(°C)	17	20	22	19	20
Solvant d'étalement	(CH ₃ CH ₂) ₂ CO	C ₆ H ₆	n-hexane	C ₆ H ₆	C ₆ H ₆
Balance	Langmuir	Langmuir	Wilhelmy	Langmuir	Langmuir

(1) De Costa et coll. (1972)

(2) Tancrede et coll. (1982)

(3) Heitier et coll. (1983)

(4) Guay et Leblanc (1987)

La comparaison des aires moléculaires pour divers états de compression de la chlorophylle a est présentée au Tableau 5. Les techniques et conditions expérimentales utilisées par différents auteurs y sont également rapportées. La différence maximale entre nos résultats et les valeurs rapportées est de 6 Å² molécule⁻¹. Considérant la sensibilité de cette molécule à divers facteurs externes (Katz et coll. (1978)) et les diverses méthodes d'extraction utilisées, nous considérons que nos valeurs sont en accord avec celles rapportées dans la littérature.

5.2 Le système mixte chlorophylle a-cytochrome c

5.2.1 Le simple cycle expansion-compression. Nous avons étudié les propriétés interfaciales du système mixte chl a-cyt c en utilisant la même méthodologie rapportée pour le système PC(18:1)-cyt c. La Figure 52 présente les isothermes Π - σ et ΔV - σ obtenues pour la chl a et le mélange chl a-cyt c. Immédiatement après l'injection du cytochrome c dans la sous-phase, il est possible de constater que la pression et le potentiel de surface augmentent simultanément. Ces accroissements (de 2 mN m⁻¹ pour Π et +75 mV pour ΔV) traduisent l'incorporation spontanée de la protéine dans le film de chl a suite à son addition. Lorsque le film mixte est soumis à une première expansion, un décalage progressif des isothermes Π - σ et ΔV - σ vers de plus grandes valeurs de σ reflète l'incorporation graduelle de la protéine. Lorsque le film mixte est comprimé, les isothermes de pression et de potentiel de surface

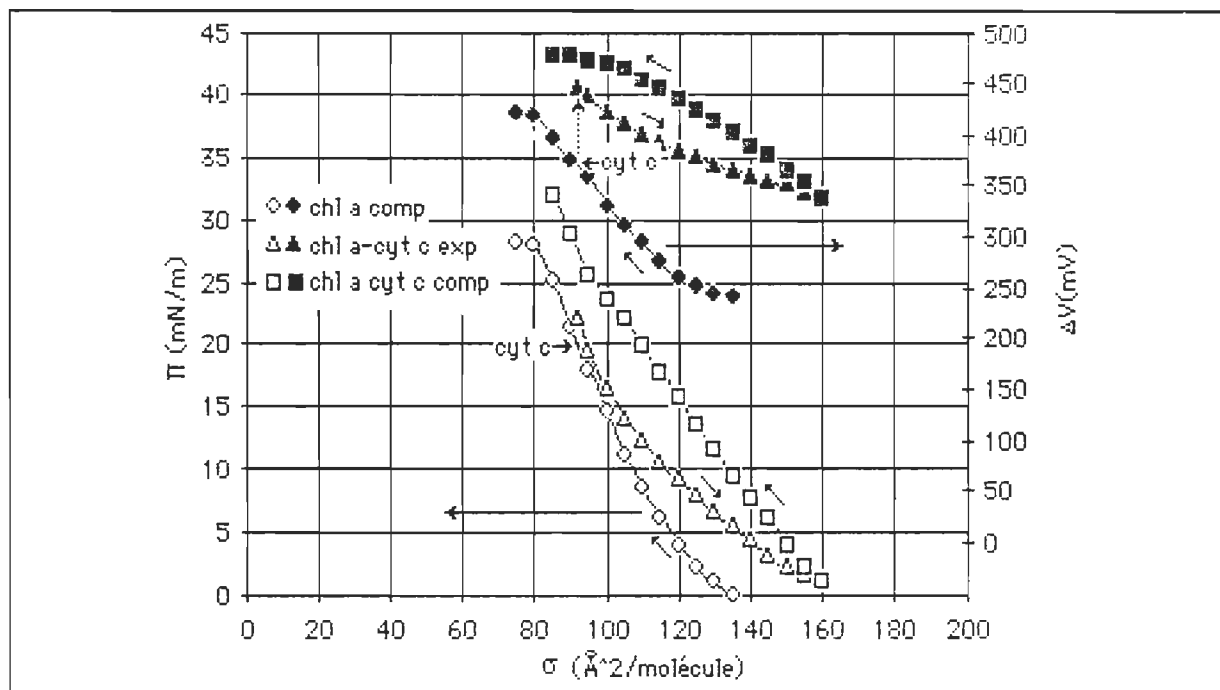


Figure 52. Isothermes Π - σ et ΔV - σ obtenues pour la chl a et pour le mélange chl a-cyt c étalés à l'interface air-tampon Tris 10^{-3} M, pH=8.0. Le cytochrome c fut injecté sous la monocouche de chl a comprimée à 20 mN m^{-1} . Suite à l'homogénéisation du système, le film fut décomprimé puis recomprimé. Les conditions expérimentales sont identiques à celles rapportées à la Fig.49. $[\text{cyt c}] = 2.3 \times 10^{-7} \text{ M}$.

obtenues demeurent distinctes de celles mesurées pour la chl a seule. De plus, il est notable que le collapse du film, mesuré à 28 mN m^{-1} , disparaît. Suite à l'incorporation du cytochrome c dans un film de chlorophylle a, autant les propriétés mécaniques que les propriétés électriques du film mixte demeurent distinctes de celles mesurées pour le film de chlorophylle a pure. Ce premier résultat démontre que l'incorporation du cyt c dans la monocouche de chl a est irréversible et que, conséquemment, l'interaction entre les deux composés est forte.

5.2.2 Les cycles expansion-compression multiples. Nous avons soumis le système chl a-cyt c à deux cycles expansion-compression ayant comme

pression de surface de référence la valeur à l'injection, soit 20 mN m^{-1} . Les isothermes Π - σ et Γ - σ obtenues sont présentées à la Figure 53. La seule phase présentant un comportement distinct est l'expansion suivant l'injection de la

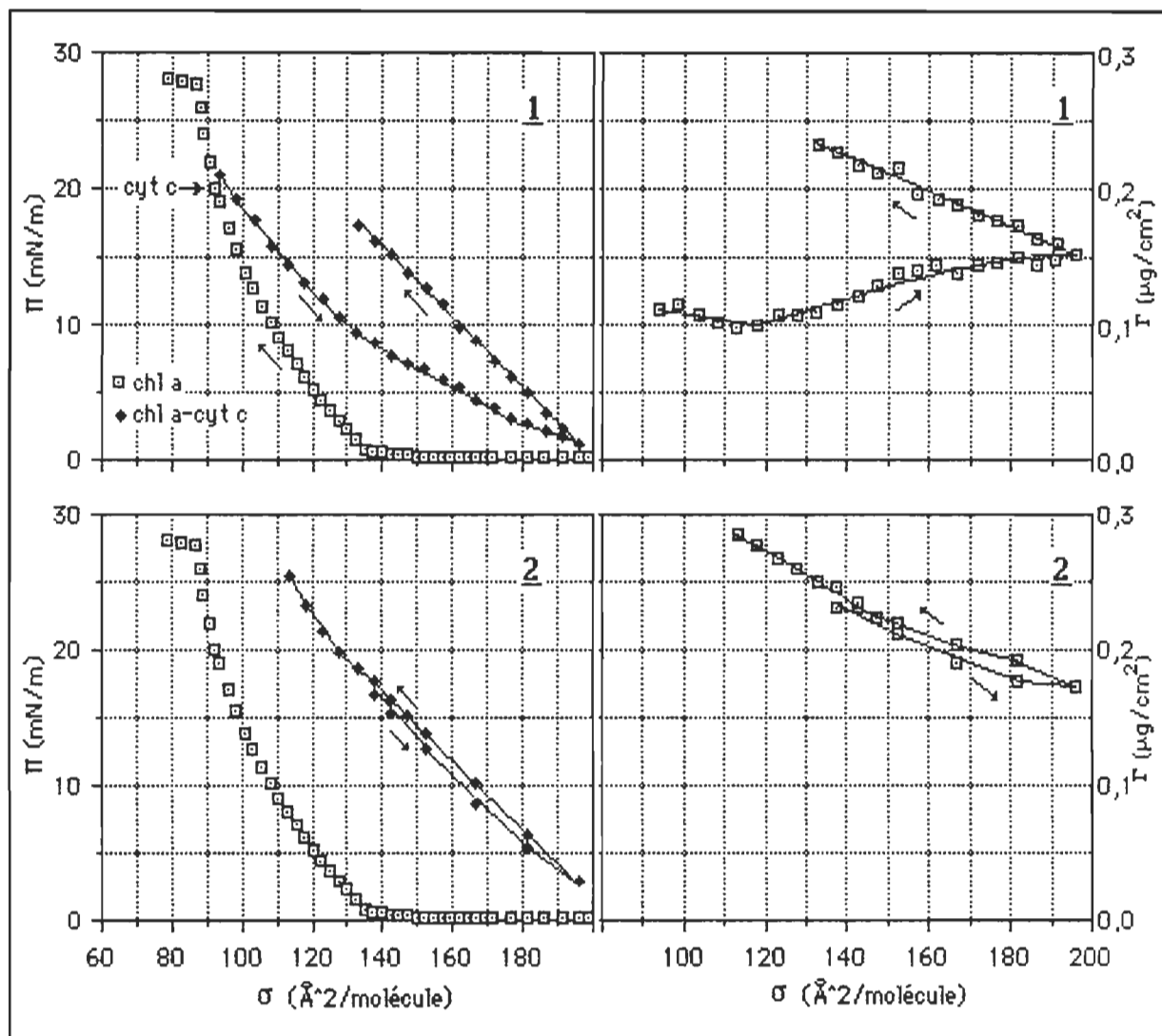


Figure 53. Isothermes Π - σ et Γ - σ obtenues pour la chlorophylle *a* et pour le système binaire chl *a*-cyt *c* soumis à deux cycles expansion-compression. Suite à l'injection de la protéine à 20 mN m^{-1} , la pression de surface s'est accrue de 2 mN m^{-1} , reflétant l'incorporation spontanée de la protéine. Le film fut alors soumis à deux cycles expansion-compression consécutifs. Les conditions expérimentales sont identiques à celles rapportées aux Figs. 49 et 52. L'activité spécifique du $[^{14}\text{C}]$ cytochrome *c* était de $3,4 \text{ } \mu\text{Ci mmol}^{-1}$ et le rendement du détecteur de radioactivité de 21%.

protéine. Par la suite, que ce soit en compression ou en expansion, les isothermes obtenues sont identiques. Ce comportement démontre que la première expansion permet à la protéine, déjà faiblement ancrée à la monocouche, de s'incorporer efficacement dans le film. Toute compression ou expansion subséquente aura pour seul effet de comprimer ou de dilater le nouveau film sans changer la proportion de ses constituants. Les isothermes de concentration interfaciale de cytochrome c montrent que, suite à l'incorporation de la protéine, la compression a pour effet d'accroître la concentration superficielle de cyt c alors que l'expansion donne l'effet inverse.

Les mesures de Γ présentées à la Figure 53 ont été converties en nombre d'équivalents-résidus associés par chlorophylle (Fig. 54) et en fraction molaire résiduelle (Fig. 55). Dans le cas de la mesure de la concentration interfaciale du

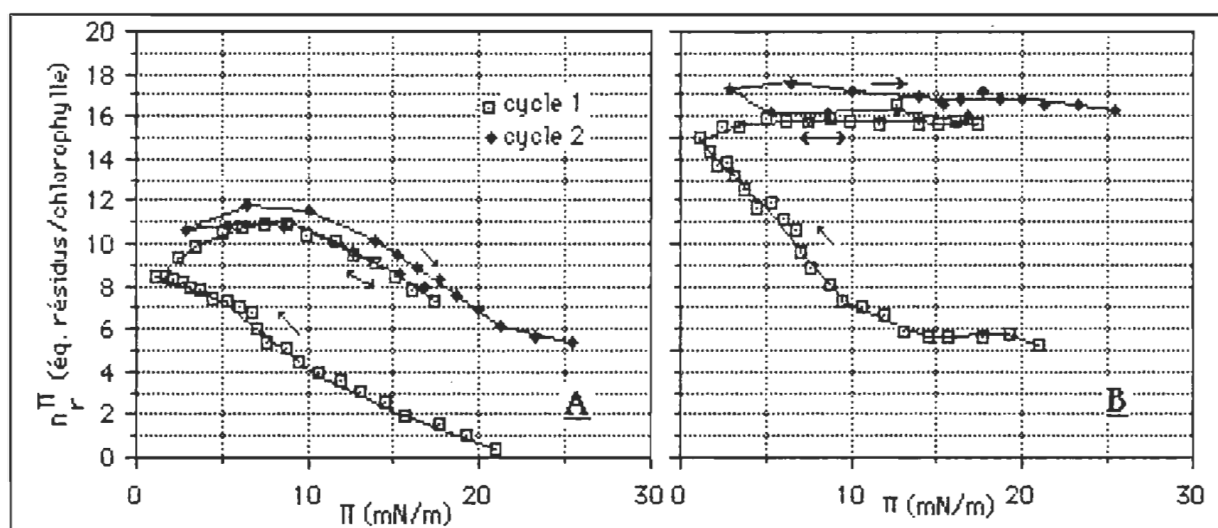


Figure 54. Relation entre le nombre d'équivalents-résidus associés par molécule de chlorophylle a et l'état de compression de la monocouche. Ces valeurs furent estimées depuis (A) la différence des isothermes Π - σ obtenues pour la chl a seule et le mélange chl a-cyt c, ou (B) par mesure de radioactivité de surface. Ces deux méthodes de détermination de n_r^Π ont été appliquées aux deux cycles expansion-compression présentés à la Figure 53.

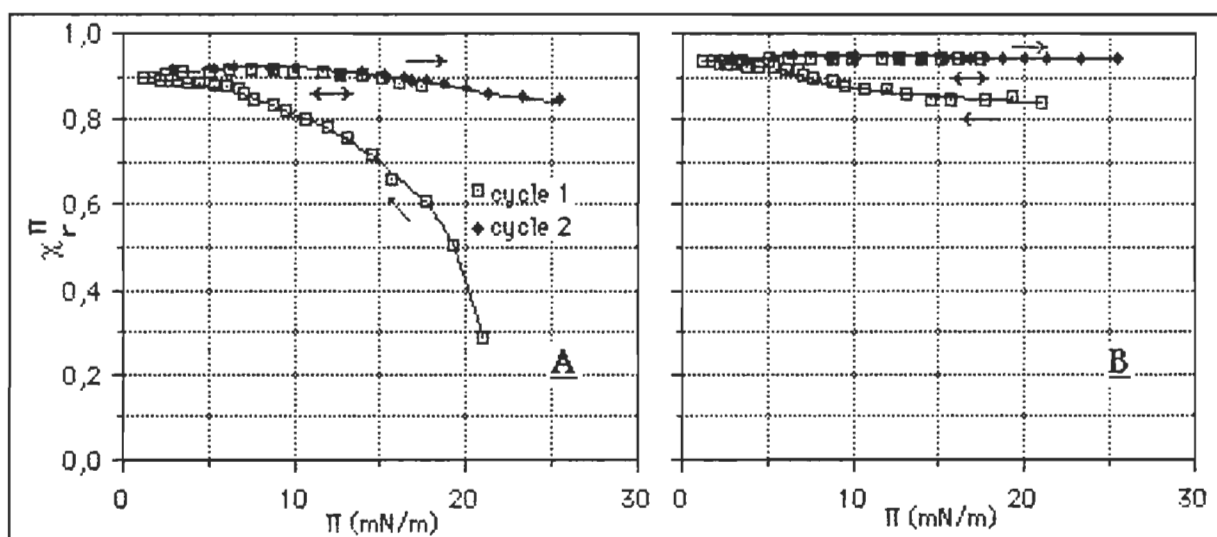


Figure 53. Relation entre la fraction molaire résiduelle de protéine ($\chi_{r\Pi}$) et l'état de compression de la monocouche. Ces valeurs furent estimées depuis (A) la différence des isothermes Π - σ obtenues pour la chl a seule et le mélange chl a-cyt c, ou (B) par mesure de radioactivité de surface. Ces deux méthodes de détermination de $\chi_{r\Pi}$ ont été appliquées aux deux cycles expansion-compression présentés à la Figure 53.

cytochrome c incorporé dans une monocouche de PC(18:1), une concentration de base était retranchée pour tenir compte de la radioactivité provenant de la sous-phase. Ces seuils, variant entre 0,0020 et 0,035 $\mu\text{g cm}^{-2}$, furent déterminés en considérant la mesure de concentration établie alors que la protéine était complètement exclue du film ($\Pi=30 \text{ mN m}^{-1}$). Dans le cas du système chl a-cyt c, une telle référence n'existe plus car, comme nous venons de le voir, une fois la protéine ajoutée au système, son incorporation est immédiate et irréversible. Nous nous contenterons de mentionner que les résultats présentés à la Fig. 53 ont été obtenus dans les mêmes conditions de concentration que les résultats présentés à la Fig. 43. Conséquemment, s'il y a une contribution de la sous-phase à la mesure de Γ , les concentrations interfaciales présentées à la Fig 53 sont surévaluées d'au plus 0,035 $\mu\text{g cm}^{-2}$.

N'ayant aucune certitude que ce processus soit effectif, les graphiques présentés aux Figures 54 et 55 furent établis à partir des valeurs de Γ non-corrigées.

La Figure 54 présente le nombre d'équivalents-résidus associés par molécule de chlorophylle a pour divers états de compression obtenus lors des deux cycles expansion-compression. La portion (A) du graphique présente les valeurs estimées à partir des différences mesurées entre les isothermes de la chl a et du mélange chl-cyt c alors que les valeurs présentées en (B) furent directement estimées de la mesure de Γ . Quoique les deux méthodes d'estimation de $n_{r^{\Pi}}$ mettent en relief que le comportement de la première expansion est différente des comportements observés lors des expansions et compressions subséquentes, deux différences majeures apparaissent. La première de ces différences réside dans le fait que les valeurs de $n_{r^{\Pi}}$ mesurées par radioactivité de surface sont supérieures aux valeurs estimées à partir de Δa . Même si la surestimation des concentrations mesurées par radioactivité aurait pour effet de rapprocher les valeurs estimées par les deux méthodes, elle ne peut compter pour la totalité de l'écart. La correction des mesures de radioactivité aurait pour effet de réduire les valeurs de $n_{r^{\Pi}}$ de 1,6 à 3,8 éq. résidus par chlorophylle, alors que les différences observées se situent entre 5 et 10 éq. résidus par chlorophylle. Cette différence constitue un premier indice montrant que pour le système chl a-cyt c, le nombre de résidus associé à chaque chlorophylle ne peut être simplement estimé à partir de Δa . La seconde différence entre les deux méthodes de détermination de $n_{r^{\Pi}}$ concerne le comportement du système suite à la première expansion. Lors de

la compression suivant l'incorporation initiale, la valeur de $n_{r\Pi}$ passe de 12 à 5 éq. résidus par chlorophylle alors que le système est comprimé de 8 à 25 mN m⁻¹. Ce comportement est la conséquence de la diminution de Δa alors que la pression du film est accrue. Cependant, la valeur de $n_{r\Pi}$ estimée par radioactivité est relativement invariable et ce peu importe l'état de compression du film. Ainsi, suite à l'expansion initiale, la concentration de cytochrome c estimée par radioactivité de surface demeure inchangée entre 15 et 17 éq. résidus par chlorophylle de 3 à 25 mN m⁻¹.

Cette différence entre le nombre de résidus évalué par radioactivité et à partir des Δa peut être expliquée par une observation expérimentale. Nous constatons que suite à l'incorporation du cyt c dans un film de chl a, le collapse du film disparaît et que la compressibilité du film diminue au-delà de 25 mN m⁻¹. Alors que nous continuons la compression du film mixte jusqu'à une pression de surface voisine de 50 mN m⁻¹, nous pouvons voir apparaître des filaments verts à l'interface. Ces filaments peuvent être recueillis à l'aide d'une fine tige de verre. L'apparition de ces structures démontre que le système mixte bidimensionnel acquiert une structure tridimensionnelle en cours de compression. La transition entre les systèmes bidimensionnel et tridimensionnel doit se traduire par une diminution du matériel contribuant aux propriétés de surface de la monocouche, de telle sorte que la diminution de Δa notée en compression doit correspondre à la structuration tridimensionnelle du film et non pas à la désorption du cytochrome c. Ce modèle explique que le nombre de résidus associés par chlorophylle est relativement stable lorsqu'évalué par radioactivité de surface alors que nous

constatons une diminution de cette même valeur lorsqu'elle est estimée à partir des Δa .

La formation de ce solide chlorophylle-protéine présente un certain intérêt. Comme nous venons de le mentionner, ce solide peut être recueilli à l'aide d'une tige de verre lorsque le film est hautement comprimé. Nous avons déposé des multicouches du système chl a-cyt c sur des lames de quartz à 20 mN m^{-1} . D'une part, il fut constaté que le rendement du transfert se fait de moins en moins bon au fur et à mesure que le nombre de couches déposées augmente. Ce comportement traduit probablement le fait que les caractères hydrophobe et hydrophile sont moins bien localisés alors que le cyt c interagit avec le chl a. D'autre part, afin de décrocher des multicouches de chl a déposées sur une lame de verre, il est suffisant de les rincer à l'acétone. Lorsque nous tentons la même expérience avec des multicouches de chl a-cyt c, seulement une partie du matériel est éluee avec le solvant. Le spectre d'absorption de la solution de rinçage présente les caractéristiques exactes d'une solution diluée de chl a dans l'acétone. Que ce soit en utilisant le benzène, l'acétone, l'éthanol, le méthanol ou l'eau, il est impossible de solubiliser le solide de coloration verte qui demeure accroché à la lame. En grattant à l'aide d'une spatule une certaine quantité de ces lames, nous sommes parvenus à ramasser une certaine quantité de ce solide présentant un aspect fibreux. Comme le solide apparaît insoluble dans les solvants organiques et dans l'eau, nous avons tenté de le solubiliser dans des solutions de SDS, de Triton X-100 et d'octylglucoside. Le solide apparaît également insoluble dans les solutions de détergents, même lorsque nous y laissons

incuber le solide à 90°C. L'apparente insolubilité de ce complexe est fort surprenante. Elle présente toutefois des applications intéressantes dans la mesure où le cyt c joue un rôle stabilisateur lorsqu'associé à la chlorophylle.

5.2.3 Le système chl a-cyt c: un exemple de forte interaction pigment-protéine. L'irréversibilité de l'incorporation du cytochrome c dans une monocouche de chlorophylle a de même que la non-égalité des concentrations interfaciales de la protéine estimées depuis le Δa et mesurées par radioactivité de surface dénotent la force de l'interaction entre ces deux composés. Nous avons voulu, de plus, vérifier l'applicabilité du modèle permettant d'exprimer les μ_1 du mélange à partir des propriétés de surface des composés purs.

La Figure 56 présente l'isotherme μ_1 - Π qui résulte de la transformation des isothermes ΔV - σ présentées à la Fig. 49 et celle calculée à l'aide du modèle présenté à la Section 4.2.2. Nous pouvons constater qu'il y a incompatibilité complète entre les valeurs calculées et mesurées. Dans tous les cas, les valeurs mesurées sont supérieures aux valeurs calculées. Dans le cas du système PC(18:1)-cyt c, ce sont les valeurs calculées qui sont, lors de la compression, très légèrement supérieures aux valeurs mesurées. La différence entre les μ_1 mesurés et μ_1 calculés ($\Delta\mu$) est présentée, pour divers états de compression, à la Fig. 57A. Alors que pour le système PC(18:1)-cyt c la valeur maximale de $\Delta\mu$ était de 50 mD, elle varie entre 200 et 350 mD pour le système chl a-cyt c.

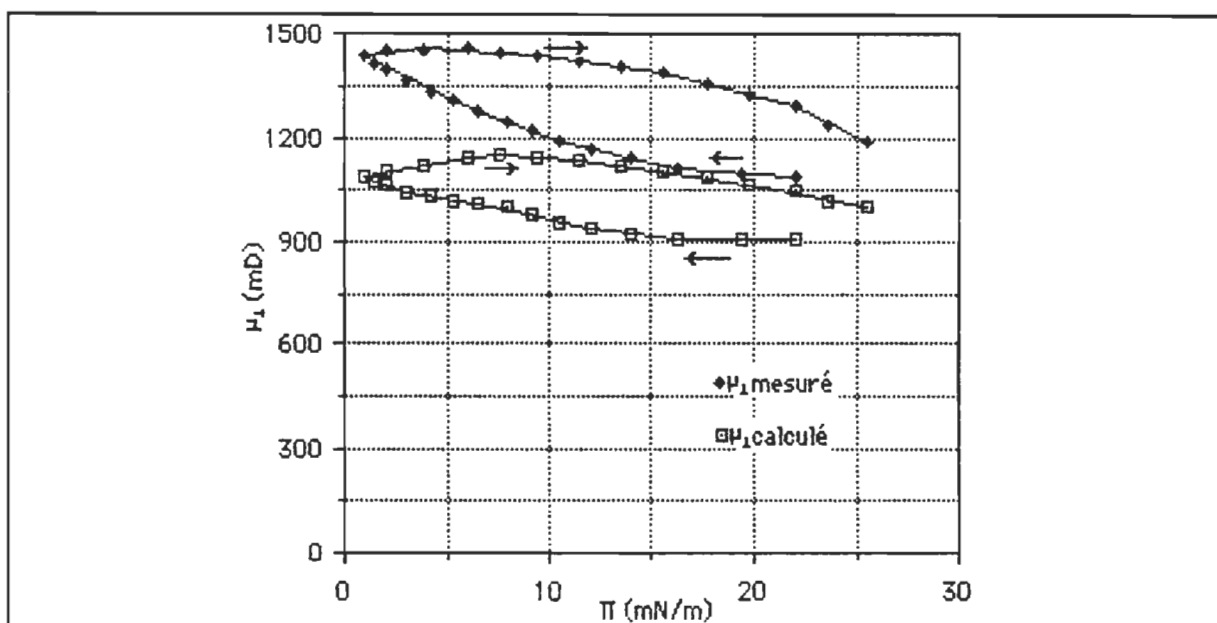


Figure 56. Comparaison des isothermes mesurée et calculée du moment dipolaire perpendiculaire (μ_{\perp}) en fonction de la pression de surface (Π) pour le système mixte chlorophylle *a*-cytochrome *c*. L'isotherme mesurée rapportée dans cette figure est la transformation de l'isotherme $\Delta V-\sigma$ rapportée à la Figure 52.

Cet écart entre les moments dipolaires mesurés et calculés provient-il d'une différence du moment dipolaire de la chlorophylle, du cytochrome *c* ou un effet combiné des deux?

Si la mauvaise estimation des moments dipolaires calculés provient d'une modification du μ_{\perp} de la chl *a* et que cette modification est présente à toutes les pressions de surface, la différence $\Delta\mu$ doit être constante pour les divers états de compression. Comme il peut être constaté à la Figure 57 A, ce n'est pas le cas. De plus, une telle différence ne parvient pas à expliquer la différence notée entre la compression et l'expansion. Comme la différence croît lors de l'expansion et décroît lors de la compression, il est tentant d'affirmer que cet écart dépend de la concentration de protéine. La Figure 57B, qui

présente le $\Delta\mu$ rapporté par équivalent-résidu, nous permet de vérifier cette dépendance. Or il apparaît que le $\Delta\mu/n$ n'est pas invariable en compression et

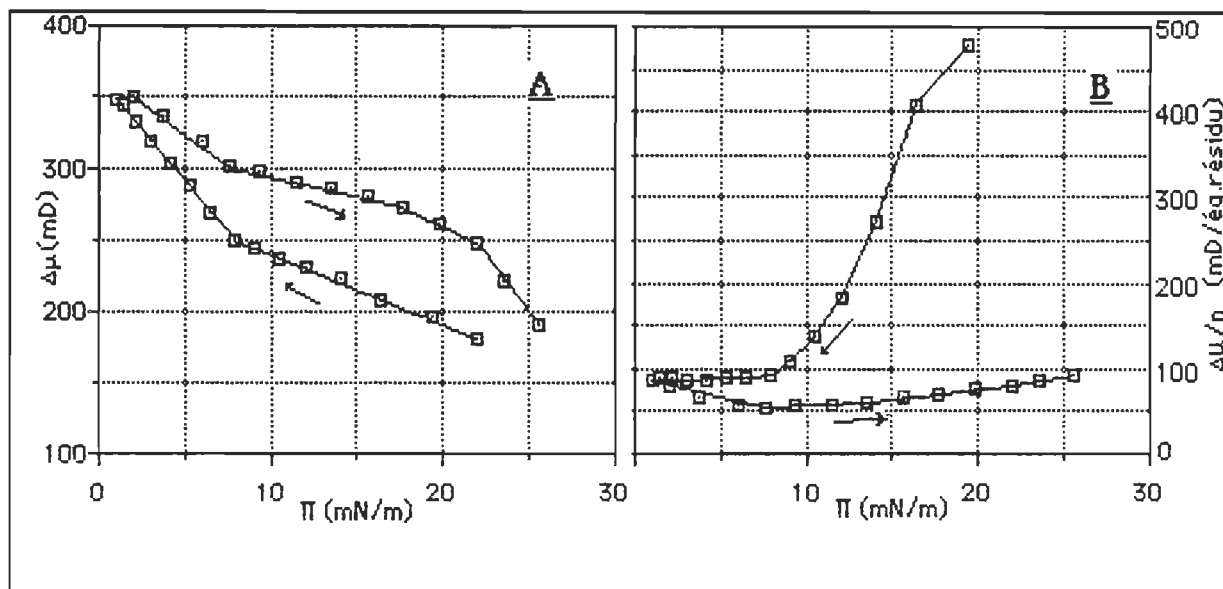


Figure 57. A) Différence entre les moments dipolaires perpendiculaires (μ_{\perp}) mesurés et calculés présentés à la Figure 56. Afin de vérifier si la différence, $\Delta\mu_{\perp}$, est une fonction du nombre d'équivalent-résidu, les $\Delta\mu_{\perp}$ présentés en (A) furent divisés par $n_r\Pi$ estimé à partir de Δa . Ce résultat est présenté en (B).

en expansion indiquant que la déviation à la loi d'additivité n'est pas simplement modulée par la fraction de protéine associée à la monocouche de chl a. Ces différences, lorsqu'exprimées par équivalent-résidu, sont énormes puisqu'elles oscillent entre 100 et 500% de la valeur d'un résidu considéré à la même pression de surface

Dans le cas du système PC(18:1)-cyt c, nous avons évalué à 250 J mol lipide (mol eq.résidus)⁻¹ l'énergie de stabilisation de la protéine dans la monocouche lipidique. Cette évaluation fut effectuée en considérant la différence d'énergie existant entre l'adsorption et la désorption du cytochrome

c d'une monocouche de PC(18:1). Pour ce faire, nous avons considéré une série de cycles ayant comme référence commune un état où la protéine est exclue du film. Dans le cas du système chl a-cyt c, un tel état n'existe pas puisque dès l'injection de la protéine, l'incorporation est immédiate. L'incorporation du cyt c dans la couche de chl a correspond même à un accroissement de l'énergie libre de surface comme en témoigne l'augmentation de la pression de surface de quelques mN m^{-1} . Pour la première expansion, la quantité de protéine incorporée croît alors que le nombre de résidus associés par chlorophylle demeure invariable lors des expansions et compressions suivantes (Fig. 54B). L'irréversibilité de l'incorporation de la protéine rend impossible l'utilisation du formalisme décrit à la Section 4.2.2.1 afin de quantifier l'interaction entre les deux composés. En plus de son irréversibilité, la force de l'incorporation du cytochrome c dans une monocouche de chlorophylle a est dénotée par l'incapacité de la loi d'additivité à prévoir la concentration protéique et les moments dipolaires du mélange. Les spectroscopies d'absorption et de fluorescence furent également mises à profit afin de qualifier l'interaction entre les deux composés.

5.3 Propriétés optiques du mélange chlorophylle a-cytochrome c.

Quoique leur capacité à mettre en relief la spécificité d'une interaction est faible, les spectroscopies d'absorption et de fluorescence n'en demeurent pas moins des outils couramment utilisés afin de vérifier l'état d'agrégation de la chlorophylle. Ainsi, le spectre d'absorption de la chlorophylle mesuré "in vivo"

présente un maximum à des longueurs d'onde supérieures aux valeurs mesurées pour des solutions diluées. Comparativement à la valeur de 661 nm rapportée pour la chl a en solution dans le benzène (Seely et Jensen (1965)), les diverses formes de chlorophylle associées à la membrane du thylacoïde présentent des maxima compris entre 670 et 682 nm (Brown (1972, 1980, 1983); Anderson et coll. (1978); Brown et Schoch (1981)). Ce déplacement bathochrome du maximum d'absorption est expliqué par deux processus qui peuvent être indépendants ou concurrents soit: un accroissement de la polarité du milieu environnant et l'intensification des interactions chromophore-chromophore médiée par l'organisation des molécules de chl a à l'intérieur du polypeptide. Cet effet est également mis en relief par la technique des monocouches; le maximum d'absorption dans le rouge rapporté pour une monocouche condensée est de 680 nm (Bellamy et coll. (1963); De Costa et coll. (1972); Hirsch et Brody (1979)). Plus récemment, Heithier et ses collaborateurs (1983) ont montré que la position de ce maximum est faiblement influencée par l'état de compression du film; en comprimant la monocouche de 3 à 21 mN m⁻¹, le maximum d'absorption dans le rouge passe de 676 à 678 nm.

Dans un travail classique, Brown (1972) a déconvolué les spectres d'absorption de diverses sources de chloroplastes afin de mettre en évidence l'existence de quatre formes universelles de chlorophylle a: ca 661,6; ca 669,6; ca 677,1 et ca 683,7. Une étude subséquente menée sur trois composantes de la membrane du thylacoïde a incité l'auteur à se rétracter et à affirmer que plusieurs formes de chl a distinctes existent. Ces résultats mettent en évidence

la portée réelle de la question, à savoir: existe-t-il certains états standards de chlorophylle retrouvés dans les diverses structures membranaires ou bien ces formes sont-elles aussi nombreuses qu'il y a de chlorophylles? Cette délicate question demeure sans réponse.

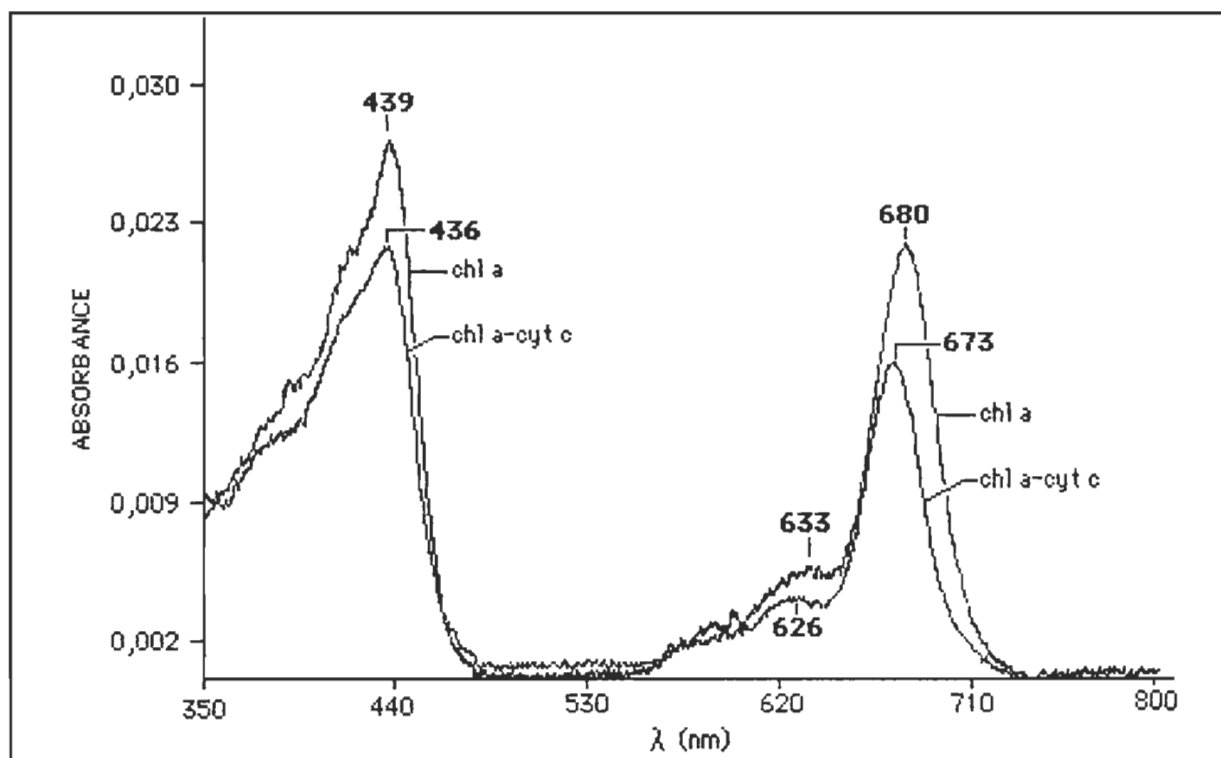


Figure 58. Spectres d'absorption de la chlorophylle a et du mélange chlorophylle a-cytochrome c en films Langmuir-Blodgett sur une lame de quartz hydrophile déposés à une pression de surface de 20 mN m^{-1} . Les spectres sont obtenus pour deux monocouches, soit une de chaque côté de la lame. Ces spectres sont représentatifs des résultats obtenus pour un minimum de dix lames. Conditions d'opération du spectromètre Perkin-Elmer 553: vitesse de balayage de 120 nm min^{-1} , temps de réponse de 0,5 s et largeur de fente de 1 nm.

Nous avons utilisé la spectroscopie d'absorption afin de sonder l'état d'agrégation de la chlorophylle a au sein du complexe qu'elle forme avec le cytochrome c. La Fig. 58 présente les spectres d'absorption obtenus pour la chlorophylle a et le mélange chl a-cyt c, tous les deux déposés à une pression

de 20 mN m⁻¹. Le spectre obtenu pour la chl a est conforme aux valeurs présentées par Désormeaux et coll. (1985). Deux différences majeures apparaissent lorsque que le cyt c est ajouté à la chl a: 1) le maximum d'absorption est déplacé vers de plus faibles longueurs d'onde et 2) l'intensité d'absorption est moindre. Ces deux effets sont la manifestation d'un même phénomène, c'est-à-dire la dilution de la chl a par la protéine. Il est également possible de mesurer la même tendance lorsque la chlorophylle a est diluée avec un lipide formant un mélange miscible (Picard et coll. (1986); Picard (1988)). La diminution de l'absorption de 0,010 (chl a) à 0,008 (chl a-cyt c) unités par monocouche est en accord avec le fait qu'en moyenne, pour les films ayant servi à préparer les lames, l'aire moléculaire du système chromophore-protéine était, à cette pression de surface, de 28 % supérieure à l'aire mesurée pour la chl a seule. Ainsi, la diminution de l'absorption est le reflet direct de la dilution du pigment.

Une confirmation supplémentaire de l'effet diluant du cytochrome c incorporé dans une monocouche de chl a est donnée par les spectres d'émission de fluorescence (Figure 59). Autant pour la chl a seule que pour le mélange chl a-cyt c, il y a une correspondance parfaite entre le spectre d'excitation et le spectre d'absorption dans le bleu. Il est important de préciser dans un premier temps que l'intensité de fluorescence est fort variable pour des films de même nature. Ainsi, il est impossible d'obtenir une série de spectres présentant des intensités de fluorescence reproductibles. Ce phénomène demeure inexpliqué. Nous avons cependant noté que l'intensité de fluorescence du système mixte chl a-cyt c est approximativement de moitié

moins que celle mesurée pour la chl a seule. Ainsi les spectres présentés à la Figure 59 ont été portés sur une échelle arbitraire et c'est à titre indicatif que l'intensité de fluorescence du mélange chl a-cyt c a été établie par rapport à

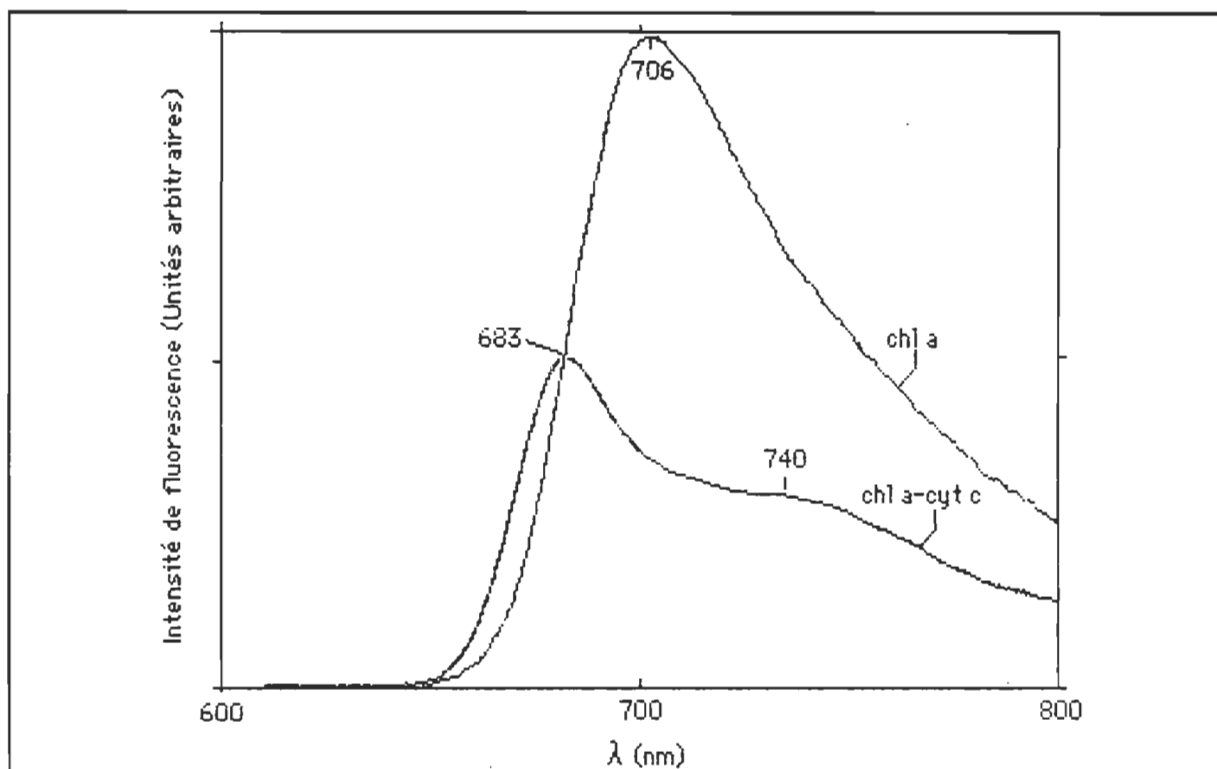


Figure 59. Spectres d'émission de la chlorophylle a et du mélange chlorophylle a-cytochrome c en films Langmuir-Blodgett sur une lame de quartz hydrophile déposés à une pression de 20 mN m^{-1} . Ces spectres sont corrigés pour la non-linéarité de la détection à l'émission. Ces spectres sont caractéristiques des résultats obtenus pour un minimum de six lames. Conditions d'opération du spectrofluorimètre Fluorolog II: λ à l'excitation de 438 (chl a) et 434 nm (chl a-cyt c), fentes à l'excitation et à l'émission de 1,5 mm.

celle de la chl a. Une bande d'émission à 706 nm est obtenue lorsque la chlorophylle a pure est excitée à 438 nm. Lorsque le cytochrome c est incorporé dans la monocouche de chlorophylle a, cette bande se scinde en une bande principale située à 683 nm et un épaulement situé à environ 740 nm.

Ce même effet est observé lorsque la chlorophylle a est diluée avec de la PC extraite du jaune d'oeuf (Picard(1986)).

Quoique le système modèle que nous utilisons est imparfait, nous constatons avec satisfaction que le spectre d'émission obtenu pour la chl a diluée par le cytochrome c correspond, par la position des maxima et la forme du spectre, aux valeurs rapportées pour les chloroplastes intacts (Krause et Weis (1984)), les thylacoïdes (Kyle et coll. (1983)), les LHCP et le CPa (Brown (1977)). Les résultats obtenus "in vivo" comme les résultats obtenus pour le système modèle fournissent cependant peu d'informations concernant la nature réelle du complexe. D'ailleurs, les spectres de fluorescence rapportés pour les chloroplastes ou les constituants se limitent à une interprétation phénoménologique. Dans le cas qui nous concerne, l'ensemble des résultats obtenus par spectroscopies d'absorption et d'émission confirment la dilution de la monocouche de chl a par le cyt c.

5.4 La spécificité de l'interaction chlorophylle a-cytochrome c: le rôle du magnésium

Autant pour les interactions endogames que pour les interactions exogames, la chlorophylle a présente la particularité d'agir à la fois comme donneur et accepteur électronique. Plus spécifiquement, le groupement carboxyle du cycle IV possède des propriétés nucléophiles alors que le magnésium central, qui possède un nombre de coordination de 4, présente des

propriétés électrophiles. Cette particularité que possède la molécule de chl a, en présentant des caractères opposés en des points distincts de sa structure, permet la formation endogame de dimères et d'oligomères par la formation de liens $C=O \cdots Mg$ (Katz (1973)). Lors de la formation d'interactions exogames, tout groupement donneur peut interagir avec le magnésium alors que tout accepteur peut interagir avec le carboxyle. Par exemple, les protéines regorgent de groupements $C=O$ et $N-H$ pouvant jouer ces rôles. La phéophytine a présente la même structure que la chl a, sauf qu'elle ne possède pas d'atome de Mg central. Pour cette raison, nous nous sommes intéressés au système binaire phé a-cyt c. Ce système peut permettre de vérifier l'importance du magnésium central dans la stabilisation de la chl a par le cyt c.

La Figure 60 présente les isothermes $\Pi-\sigma$ et $\Delta V-\sigma$ obtenues pour la phéophytine a et le mélange phé a-cyt c. L'incorporation de la protéine fut faite de la même façon que présentée précédemment, sauf que la protéine fut injectée sous la monocouche de phé a comprimée à 10 mN m^{-1} . Ce changement fut rendu nécessaire car la monocouche de phé a est collapsée à 20 mN m^{-1} . Tout comme le système chl a-cyt c, une augmentation de Π est observée suite à l'injection du cyt c sous une monocouche de phé a. Nous ne devons pas immédiatement conclure que cette augmentation, qui reflète l'incorporation de la protéine dans le film de pigment, est similaire au phénomène observé pour le mélange chl a-cyt c. Il ne faut pas oublier que la protéine est injectée sous la pression minimale 16 mN m^{-1} , valeur où le cyt c s'adsorbe sur un film de PC (Quinn et Dawson (1969b)). Lors de l'expansion, le cyt c s'incorpore graduelle-

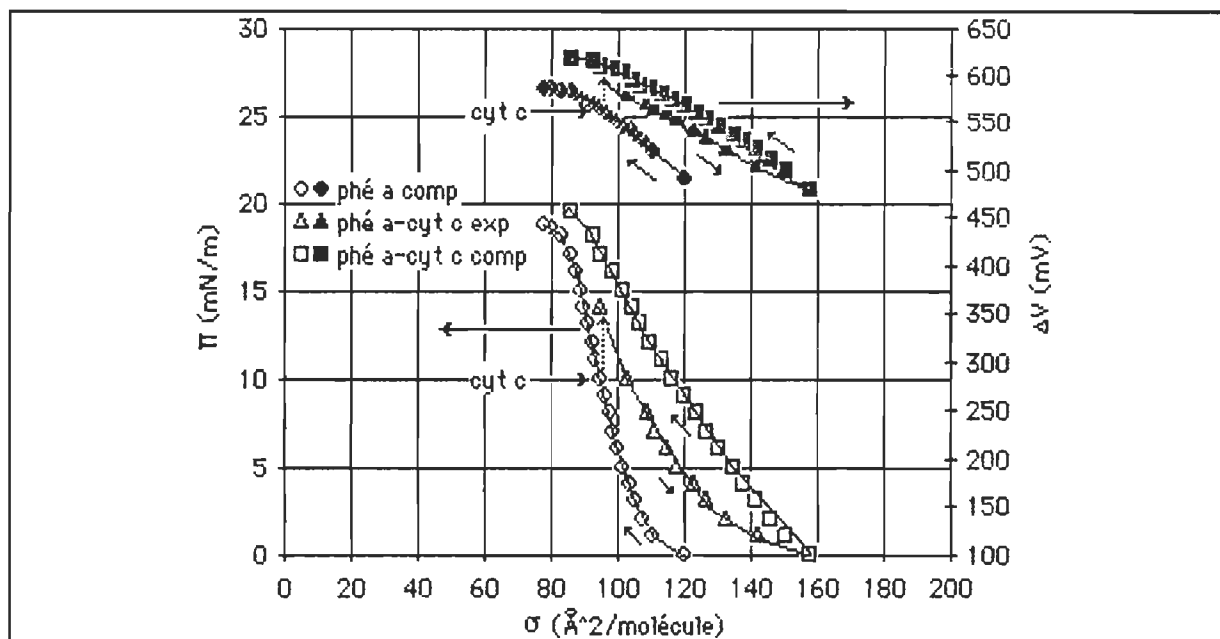


Figure 60. Isothermes Π - σ et ΔV - σ obtenues pour la phéophytine a et pour le mélange phéophytine a-cytochrome c étalés à l'interface air-tampon Tris 10^{-3}M , pH=8,0. Le cytochrome c fut injecté sous la monocouche de phé a comprimée à 10 mN m^{-1} . Suite à l'homogénéisation du système, le film fut décomprimé puis recomprimé. La phéophytine fut étalée à partir d'une solution de benzène. La température fut maintenue à $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Vitesse de compression de $6 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1} \text{ min}^{-1}$. $[\text{cyt c}] = 2,3 \times 10^{-7} \text{ M}$.

ment dans la monocouche et demeure incorporé tout au long de la compression subséquente. L'inflexion présente à 16 mN m^{-1} pour le système mixte PC(18:1)-cyt c n'est pas observée dans le cas présent, laissant présager que tout comme pour le système chl a-cyt c, l'incorporation de la protéine est irréversible suite à la première expansion. L'irréversibilité de l'incorporation est confirmée par le fait que lorsqu'un cycle supplémentaire expansion-compression est opéré suite à l'incorporation de la protéine, les isothermes sont identiques et ne présentent pas d'hystérèse. Ce phénomène, déjà observé pour le système chl a-cyt c, démontre que peu importe l'état de compression auquel nous soumettons le film mixte, il est impossible d'expulser la composante protéique.

Le système phé a-cyt c présente une seconde analogie importante avec le mélange chl a-cyt c. La Fig. 61 présente les moments dipolaires perpendiculaires mesurés et calculés. Tout comme dans le cas du système chl a-cyt c, pour l'ensemble du cycle expansion-compression, les valeurs mesurées sont supérieures aux valeurs calculées. Cette différence varie entre 120 et 260 mD. Quoique les valeurs rapportées pour le système phé a-cyt c sont supérieures à celles du mélange chl a-cyt c (ce qui est normal car le μ_{\perp} de la phé a est plus élevé que le μ_{\perp} de la chl a) le comportement des deux systèmes est similaire.

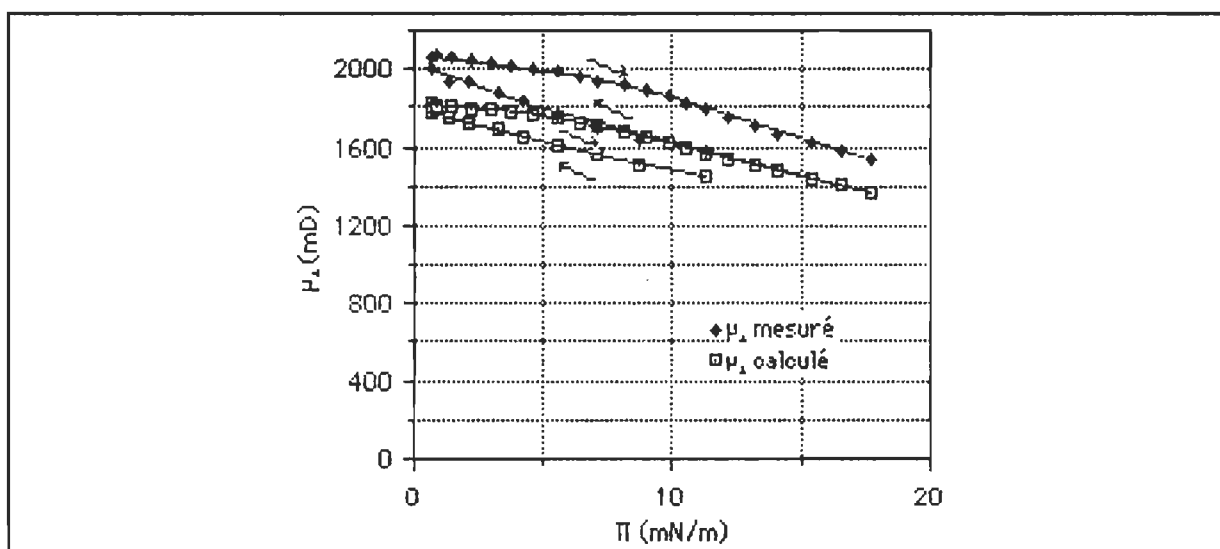


Figure 61. Comparaison des isothermes mesurées et calculées de moment dipolaire perpendiculaire (μ_{\perp}) en fonction de la pression de surface (Π) pour le système mixte phéophytine a-cytochrome c. Les valeurs rapportées dans cette Figure sont la transformation des isothermes $\Delta V-\sigma$ rapportées à la Figure 60..

Nous n'avons pu former en comprimant à de fortes pressions de surface les fibres dont nous rapportons l'existence pour le système chl a-cyt c. De plus, nous pouvons constater que le système phé a-cyt c se distingue du système chl

a-cyt c par le fait que le film mixte présente son collapse à une pression de surface voisine du collapse de la phé a.

Le mélange phé a-cyt c présente plusieurs analogies avec le système chl a-cyt c. Plus précisément, l'incorporation de la protéine dans le film est irréversible et les moments dipolaires du mélange ne peuvent être décrits comme la simple somme des propriétés des constituants. Ces deux faits suggèrent une interaction forte entre le cytochrome c et la phéophytine a. Ce système présente cependant la particularité de présenter un collapse voisin de celui de la phé a et l'incapacité de former des fibres à forte pression de surface. Ce fait indique que même si l'interaction entre la phé a et le cyt c est forte, par comparaison au système chl a-cyt c la cohérence du film formé est moindre. Le magnésium peut avoir un rôle non-négligeable dans le renforcement des interactions entre le cytochrome c et la chl a.

5.5 Les modèles d'organisation de la chlorophylle dans les thylacoïdes.

Les modèles d'organisation de la chlorophylle sont nombreux et visent tous un objectif commun; la restitution à l'aide d'une organisation modèle des propriétés naturelles de la chlorophylle. Déjà nous pouvons faire la distinction entre les propriétés structurales et fonctionnelles de la chlorophylle. C'est du premier aspect que nous avons traité dans ce chapitre.

Parmi les différents modèles d'organisation de la chlorophylle, le plus simple est sans aucun doute la solution. L'étude classique de Seely et Jensen (1965) met en évidence que le maximum d'absorption de la chl a peut simplement être modulé par la polarité du solvant. Viennent ensuite les solutions organisées. Parmi celles-ci nous retrouvons les dispersions colloïdales. C'est en utilisant ce système que Suponeva et coll. (1984) ont mis en évidence un déplacement bathochrome du maximum d'absorption dans le rouge du pigment lorsqu'un polymère de lysine et d'alanine est ajouté à une dispersion colloïdale de chl a. Dans certains cas particuliers, il est possible d'obtenir des complexes solubles de chl a. Ces complexes purent être formés entre la chl a et la plastocyanine (Davis et coll. (1985)), la chl a et l'albumine bovine (Shibata et coll. (1986)) et la chl-a et l'albumine sérique humaine (Szalay et coll. (1982)). Dans ces trois cas, les maxima d'absorption de la chlorophylle a sont voisins de 670 nm, laissant présager que la chlorophylle n'est pas hautement agrégée comme au sein d'une monocouche pure. Certains chercheurs sont également parvenus à remplacer le groupement hème de la myoglobine par des dérivés de la chlorophylle (Davis et Pearlstein (1979); Boxer et Wright (1979)). Ces derniers modèles présentent l'avantage de permettre la complexification de la chlorophylle ou de ses dérivés à des molécules de même nature que les partenaires naturels présumés: les protéines. Cependant, la spécificité de l'interaction entre le chromophore, ses partenaires protéiques naturels et la matrice lipidique dans laquelle ces protéines sont imbriquées est absente des systèmes modèles présentés. Comme nous venons de le montrer, les monocouches fournissent également un modèle d'association de la chlorophylle aux protéines. Ce système offre de plus

un contrôle fin de la densité des constituants. L'approche analytique qui vise à extraire et à caractériser les complexes présents dans la membrane du thylacoïde est également un système modèle. Quoique cette approche cherche à caractériser les réels composants membranaires, les nombreuses et complexes étapes de fragmentation et de séparation ne peuvent garantir l'intégrité fonctionnelle des divers complexes extraits. Pour s'en convaincre, il suffit de consulter la littérature scientifique qui s'y rapporte afin de constater la quantité impressionnante de dénominations utilisées afin d'énumérer les divers complexes qui composent la membrane du thylacoïde. Cette grande variabilité est en partie expliquée par les diverses méthodologies utilisées afin d'opérer l'extraction et la séparation des complexes chlorophylle-protéine. Il existe à ce jour plus de 30 dénominations différentes qui regroupent les polypeptides fixant la chlorophylle au sein des photosystèmes I et II.

Nous allons nous attarder plus précisément aux complexes chlorophylle a-protéine formés en monocouche. La littérature rapporte la formation de complexes entre la chlorophylle a et les protéines suivantes: le cyt c, le cyt f, l'albumine bovine et la plastocyanine. Les études réalisées à l'aide du système chl a-cyt c (Aghion et coll. (1969); Chin et Brody (1976); Hirsch et Brody (1980)) rapportent qu'il y a interaction entre les deux composés. Les auteurs concluent à la formation du complexe sur la base d'une déviation positive à la loi d'additivité. Quoique nous ne contestons pas la formation du complexe (nous l'avons observée et qualifiée), nous avons des réserves sur le moyen utilisé afin de déterminer cette déviation. D'une part, les auteurs ne peuvent être absolument certains que la totalité de la protéine initialement présente

dans la sous-phase ait "réagi" avec la monocouche de chl *a* et, d'autre part, nous avons montré que la loi d'additivité ne tient pas pour ce mélange; les propriétés interfaciales de la chl *a* sont grandement affectées par l'incorporation du cytochrome *c*. L'incorporation du cyt *c* dans un film de chl *a* tient plus de la réaction de surface que de l'adsorption. En utilisant le même raisonnement, Chin et Brody (1976) concluent à la formation d'un complexe entre le cytochrome *f* et la chlorophylle *a*. Nous traiterons de ce système dans le chapitre suivant. Une éventuelle réduction du ferri-cyt *c* par la chl *a* est également suggérée dans l'étude de Chin et Brody (1976). Nous trouvons cette conclusion audacieuse puisqu'elle repose sur l'accroissement de l'aire moléculaire d'un film mixte comprimé à une pression constante de 6 mN m^{-1} . Cette cinétique, qui est la même en présence et en absence de lumière, nous apparaît plutôt être la conséquence d'une adsorption de cytochrome *c* provenant de la sous-phase. Nous avons précédemment mis en évidence que ce mécanisme est effectif en deçà de 8 mN m^{-1} pour des monocouches ne présentant pas d'interaction avec le cyt *c*. L'interaction entre la chl *a* et le cyt *c* étant forte, il y a tout lieu de croire que cette cinétique ne soit pas négligeable. Nous avons pu constater un accroissement de la pression de surface de près de dix mN m^{-1} lorsque du cyt *c* est injecté sous une monocouche de chl *a* comprimée à 5 mN m^{-1} . Cette augmentation, comme il fut montré par la mesure de la radioactivité de surface, représente l'incorporation du cyt *c* dans la monocouche de pigment. De plus, dans cette étude Chin et Brody rapportent qu'une monocouche mixte chl *a*-cyt *c* présente un maximum dans le rouge situé à 687 nm et un faible pic à 733 nm. Comme ces expériences furent menées avec du cyt *c* réduit sur une sous-phase contenant de l'ascorbate à une

concentration de 10^{-3} M, nous ne pouvons comparer ces résultats avec ceux que nous présentons.

L'adsorption de l'albumine sérique bovine sur une monocouche ne provoque pas de déplacement de la bande d'absorption du pigment (Ivanovskaya et coll. (1972)). Cependant, il est rapporté que la protéine accroît de façon appréciable la stabilité chimique de la chlorophylle. Cet effet stabilisateur fut mesuré sur des périodes de plus de 20 heures alors que la chl a pure présente une dégradation importante après quelques heures. Ce comportement présente une certaine ressemblance avec la stabilité chimique du complexe chl a-cyt c.

Les résultats présentés dans ce chapitre permettent de conclure que l'interaction entre la chl a et diverses protéines est spécifique. Ainsi, l'interaction entre la chlorophylle a et une protéine peut être forte ou faible et produit ou non des changements dans les propriétés spectroscopiques du pigment. Nous supporterons cette idée de spécificité au chapitre suivant. Ce comportement porte à croire que la spécificité de l'interaction entre la chl a et certaines protéines est le reflet d'interactions entre certains résidus d'acides aminés, ou des domaines de la protéine présentant des propriétés particulières, et la chlorophylle. Plus précisément, les chaînes latérales des acides aspartique et glutamique, de l'asparagine et de la glutamine peuvent agir comme donneurs électroniques alors que la lysine, l'arginine et l'histidine peuvent agir comme accepteurs électroniques. De plus, tous ces résidus sont généralement présents à la surface hydrophile des protéines. Au niveau des

interactions qui impliqueraient un ensemble d'acides aminés, il est raisonnable de croire que la portion faisant face au milieu aérien de l'interface offre un milieu propice à la stabilisation des portions hydrophobes d'une protéine. La véritable élucidation de la spécificité de l'interaction chl-protéine retrouvée au sein des systèmes modèles requiert maintenant l'utilisation d'outils spectroscopiques spécifiques, telle la spectroscopie infrarouge. Ce genre d'étude constitue une suite logique au présent travail et devrait permettre d'identifier les caractères spécifiques impliqués dans l'interaction chlorophylle-protéine.

CHAPITRE 6

QUELQUES EXEMPLES DE SYSTEMES LIPIDE-PROTEINE ET CHLOROPHYLLE- PROTEINE PRESENTANT UNE INCIDENCE BIOLOGIQUE

Les systèmes que nous avons étudiés jusqu'à maintenant ne présentent pas d'incidence biologique directe dans la mesure où les couples caractérisés ne sont pas regroupés au sein des systèmes biologiques. Les comportements de ces systèmes peut aider à comprendre la nature des forces mises en cause lors des interactions lipide-protéine et chlorophylle-protéine prenant place dans les véritables membranes naturelles. Afin de compléter cette étude, nous avons voulu caractériser, de façon prospective, certains systèmes qui présentent une incidence biologique réelle. Nous avons d'une part mis en évidence que l'interaction entre la phosphatidylcholine bovine et le cytochrome c est hautement régie par la force ionique du milieu aqueux. D'autre part, nous avons étudié les interactions entre la chlorophylle a et trois protéines retrouvées dans les chloroplastes: la stellacyanine, la plastocyanine et le cytochrome f.

6.1 Le système PC bovine-cytochrome c

Le cytochrome c agit naturellement comme transporteur d'électrons entre les cytochromes c_1 et a; tous les deux présentent les caractéristiques de protéines membranaires. Le cyt c effectue la navette entre ces deux entités membranaires dont la diffusion latérale est grandement freinée par la matrice

lipidique. Le fait que le cyt c est hydrosoluble suggère fortement que le transfert électronique se fasse par le biais du milieu aqueux. Il devient alors important de connaître les facteurs qui provoquent l'attachement du cyt c à la membrane. Puisque la phosphatidylcholine est le majeur composant lipidique de la membrane interne de la mitochondrie (il constitue plus de 40 % des lipides totaux), il est d'intérêt de caractériser les interactions entre le cytochrome c et la PC bovine. Cependant, l'échantillon de lipide que nous utilisons est un extrait total de la PC extraite de la cervelle de boeuf. La composition en chaînes grasses de cet échantillon peut être différent de celle des mitochondries. Toutefois, en comparant les résultats obtenus pour la PC(18:1) et la PC bovine, nous ne pouvons observer d'influence du degré d'insaturation du lipide sur l'incorporation du cyt c.

Nous avons mis en évidence au Chapitre 4 que la pression latérale d'une biomembrane peut être un facteur régissant l'incorporation du cytochrome c dans une membrane de PC(18:1). Nous avons voulu vérifier si le comportement est le même lorsque que la PC bovine constitue la monocouche insoluble. Nous considérerons ensuite l'influence de la force ionique du milieu aqueux sur l'attachement de la protéine à la monocouche.

6.1.1 Les isothermes de pression et de potentiel de surface du mélange PC bovine-cytochrome c. La Figure 62 présente les isothermes Π - σ et ΔV - σ obtenues pour la PC bovine et pour le mélange PC bovine-cyt c. A notre connaissance, aucune isotherme de pression et de potentiel de surface de la PC bovine n'est rapportée dans la littérature. Si ces isothermes sont comparées à

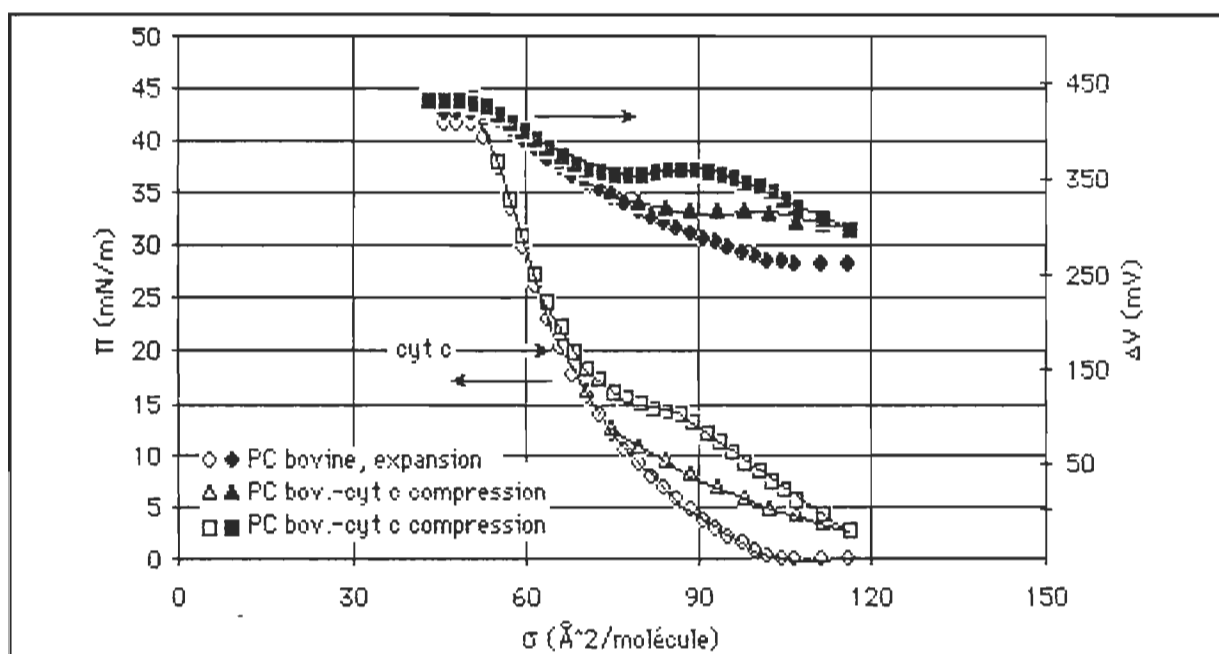


Figure 62. Isothermes Π - σ et ΔV - σ obtenues pour la PC bovine et pour le mélange PC bovine-cyt c. La protéine fut injectée sous la monocouche de lipide comprimée à 20 mN m^{-1} . Par la suite, un cycle expansion-compression fut opéré. Vitesse de compression de $5 \pm 2 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Sous-phase: Tampon Tris-HCl 10^{-3} M , pH-8,0. [cyt c] = $2,3 \times 10^{-7} \text{ M}$. La température fut maintenue à $20 \pm 1^\circ \text{C}$.

celles rapportées pour la PC(18:1), il apparaît que l'aire moléculaire est plus faible pour la PC bovine. Comme nous verrons, ce fait peut être concilié avec la plus grande insaturation de la PC(18:1). Dans le cas du mélange, la même procédure que rapportée précédemment fut utilisée afin d'incorporer la protéine. Tout comme pour la PC(18:1), aucune incorporation de protéine ne se produit suite à l'injection et l'homogénéisation de la solution de protéine sur laquelle est présente une monocouche de PC bovine comprimée à une pression de 20 mN m^{-1} . Ce n'est que lors de l'expansion que la protéine s'incorpore graduellement à la monocouche lipidique. Cette incorporation se manifeste par une dérive de l'aire moléculaire mesurée à une pression de surface donnée. Nous pouvons également noter une dérive du potentiel de surface. En recompression, les écarts entre les isothermes mesurées pour le lipide seul et

le mélange lipide-protéine demeurent relativement constants jusqu'à ce qu'une pression de 14 mN m^{-1} soit atteinte. Alors la protéine est graduellement éjectée du film lipidique. A 20 mN m^{-1} , l'écart entre les isothermes est nul, traduisant l'expulsion complète de la protéine. Autant au niveau du comportement que de la valeur de la pression limite d'éjection, le système PC bovine-cyt c présente le même comportement que le système PC(18:1)-cyt c. Cette similitude des comportements présume que le degré d'insaturation des chaînes grasses composant le lipide a peu d'influence sur l'incorporation du cyt c. Une base intéressante de comparaison du degré d'insaturation des deux lipides nous est offerte par l'indice d'insaturation, II. Pour les lipides, cet indice est défini comme:

$$II = 2 \sum_0^n c_{w\%} n \quad (6.1)$$

où n est le nombre d'insaturations présentes dans une chaîne et $c_{w\%}$ la fraction en poids de l'échantillon comportant des acides gras de ce nombre d'insaturations; dans le cas de la PC bovine, n varie de 0 à 4. En répartissant proportionnellement la fraction non-identifiée entre les sept types différents de chaînes grasses retrouvées dans la PC bovine (Tableau 2), nous calculons une valeur de II de 1,2. Comparativement à la PC(18:1) qui présente un II de 2,0, la PC bovine est moins insaturée de 40%.

L'absence d'effet du degré d'insaturation de la couche lipidique sur l'incorporation du cytochrome c est corroboré par le calcul de l'énergie de stabilisation. En appliquant la procédure présentée à la Section 4.2.2.1 à

l'isotherme de mélange présentée à la Fig. 62, nous estimons l'énergie de stabilisation du cytochrome c dans la monocouche de PC bovine à 235 ± 40 J mol lipide (mol éq. résidu)⁻¹. L'erreur sur la mesure est calculée en considérant une incertitude de 1 \AA^2 molécule⁻¹ sur l'isotherme de référence du lipide pur. Cette valeur est en bon accord avec la valeur de 250 J mol lipide (mol éq. résidu)⁻¹ mesurée pour le système PC(18:1)-cyt c. Cependant, cette constatation présente un désaccord apparent avec les études de Quinn et Dawson (1969b) et Morse II et Deamer (1973) qui rapportent que le degré d'insaturation affecte l'incorporation du cytochrome c dans des couches moléculaires. Dans l'étude de Morse II et Deamer, cette conclusion est tirée par comparaison des cinétiques d'incorporation du cytochrome c dans des monocouches d'acide octadécanoïque et octadécénoïque. D'une part, il est possible que l'extrapolation du comportement d'un système acide gras-protéine à celui d'un système lipide-protéine ne soit pas directe. D'autre part, le système acide octadécénoïque-cyt c présente un comportement particulier qui n'est pas abordé dans l'article. Dans un premier temps, il y a accroissement de la pression de surface jusqu'à un maximum de $22,4 \text{ mN m}^{-1}$ suivi d'une décroissance jusqu'à une valeur voisine de la valeur d'équilibre retrouvée pour l'acide octadécanoïque ($\Pi=17,5 \text{ mN m}^{-1}$). Les auteurs ont considéré le second maximum comme étant la valeur d'équilibre. L'existence de ce comportement biphasique nous pose un problème en ce qui concerne les processus d'incorporation-éjection qu'il suppose et l'applicabilité de ces résultats au comportement d'un système lipide-protéine. Pour ces raisons, nous n'en tiendrons pas compte. Une seconde étude rapporte que l'adsorption du cytochrome c est différente sur des monocouches natives et hydrogénées

de PC extraite d'oeuf. L'hydrogénation, tel que démontré par les auteurs, permet la conversion complète des chaînes grasses insaturées en leurs équivalents saturés. L'hydrogénation du lipide ne change pas la pression limite à partir de laquelle l'incorporation du cyt c cesse ($\Pi=20 \text{ mN m}^{-1}$). Il est toutefois rapporté que pour des pressions initiales inférieures à 20 mN m^{-1} , l'accroissement de la pression de surface est deux fois plus important lorsque le lipide est insaturé. Quoique nous n'avons pas effectué de mesures avec des lipides saturés, les résultats que nous obtenons pour des lipides présentant des degrés d'insaturation différents ne vont pas dans ce sens. Il est difficile de trancher la question de compatibilité de nos résultats avec ceux présentés par Quinn et Dawson car la différence rapportée par ces auteurs est présente pour une monocouche entièrement saturée. De plus, il n'est pas impossible que la méthodologie expérimentale utilisée, c'est-à-dire la mesure d'une cinétique d'accroissement de Π versus la mesure d'une isotherme de compression continue, influence significativement le résultat. Afin d'illustrer cette éventuelle différence, nous mettrons en relief que, tout comme ces auteurs, nous identifions que la pression maximale à laquelle l'adsorption peut se produire est de 20 mN m^{-1} . Cependant, les cinétiques d'adsorption du cytochrome c sur une monocouche de PC montrent que la pression de surface d'équilibre produite par le cyt c varie en fonction de la pression de surface initiale de la monocouche lipidique. Une telle dépendance n'est pas observée avec notre système dynamique; les limites d'incorporation et d'éjection sont invariablement les mêmes peu importe la limite inférieure de Π atteinte lors de l'expansion. Cette différence des résultats obtenus par des méthodologies différentes peut à elle seule faire l'objet d'une étude complète.

6.1.2 Influence de la force ionique de la sous-phase sur l'incorporation du cytochrome c dans une monocouche de PC bovine. Les isothermes Π - σ et ΔV - σ obtenues pour le mélange PC bovine-cyt c sur des sous-phases contenant 0,1; 0,3; 0,5 et 1,0 M de NaCl sont présentées aux Figures 63 à 66 inclusivement. Ces isothermes furent obtenues dans des conditions similaires de concentration de protéine, du nombre de lipides déposés et de rapport surface-volume du bain. Il ressort clairement des Figures 62 à 66 que l'incorporation du cytochrome c dans une monocouche de PC bovine est graduellement inhibée alors que la force ionique de la sous-phase est accrue. Cette inhibition se manifeste par la double perte des décalages notés entre les isothermes Π - σ et ΔV - σ mesurées pour le lipide et le mélange lipide-protéine. L'effet est d'autant plus marqué sur les isothermes ΔV - σ qu'une contribution supplémentaire, attribuable à la formation d'une double couche ionique, vient masquer l'accroissement de ΔV dû à l'incorporation de la protéine. Le potentiel électrique, Ψ , associé à cette double couche provoque notamment une augmentation du potentiel de surface mesuré pour le lipide au point de montée de 260 à 310 mV alors que la concentration en NaCl passe de 0 à 1 M. Nous n'avons pas tenté de concilier cette croissance du potentiel de surface avec la théorie. Les isothermes Π - σ du lipide seul ne sont pas affectés par l'addition de NaCl. Pour les cycles expansion-compression présentés aux Figures 62 à 66, la quantité maximale de protéine incorporée, estimée à partir du Δa mesurée au maximum d'expansion, passe de 3,8 à 1 éq. résidu par lipide

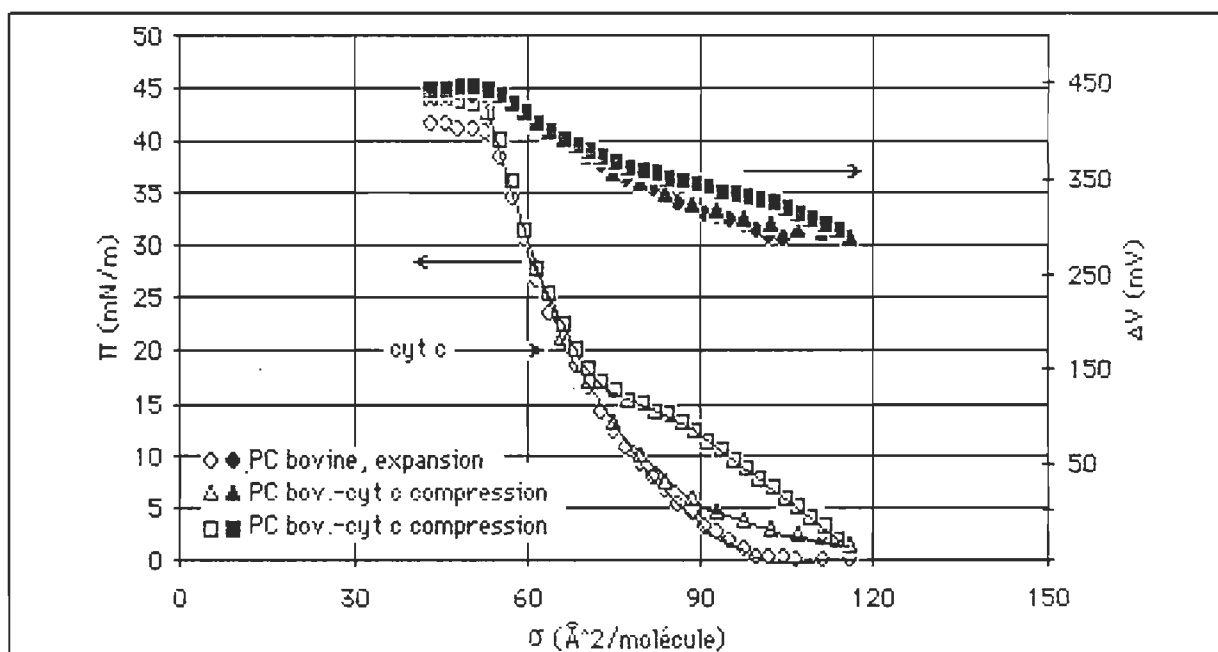


Figure 63. Isothermes Π - σ et ΔV - σ obtenues pour la PC bovine et pour le mélange PC bovine-cyt c. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles rapportées à la Fig. 62 sauf que la sous-phase contient 0,1 M de NaCl purifié par extraction au chloroforme.

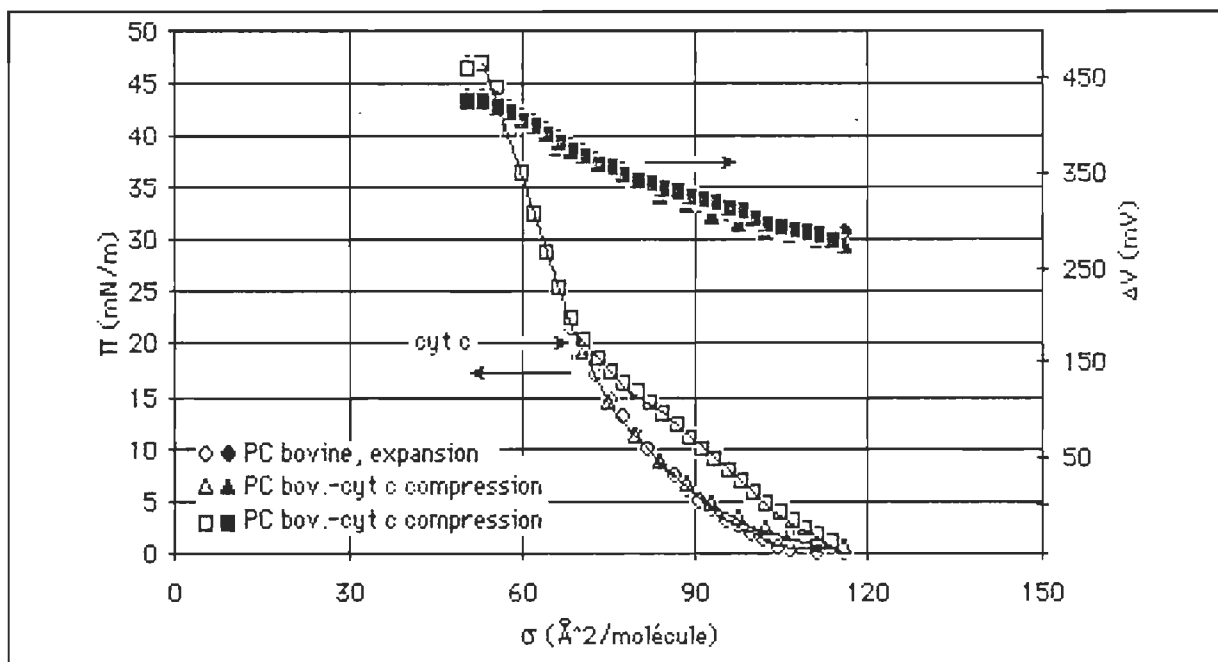


Figure 64. Isothermes Π - σ et ΔV - σ obtenues pour la PC bovine et pour le mélange PC bovine-cyt c. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles rapportées à la Fig. 62 sauf que la sous-phase contient 0,3 M de NaCl purifié par extraction au chloroforme.

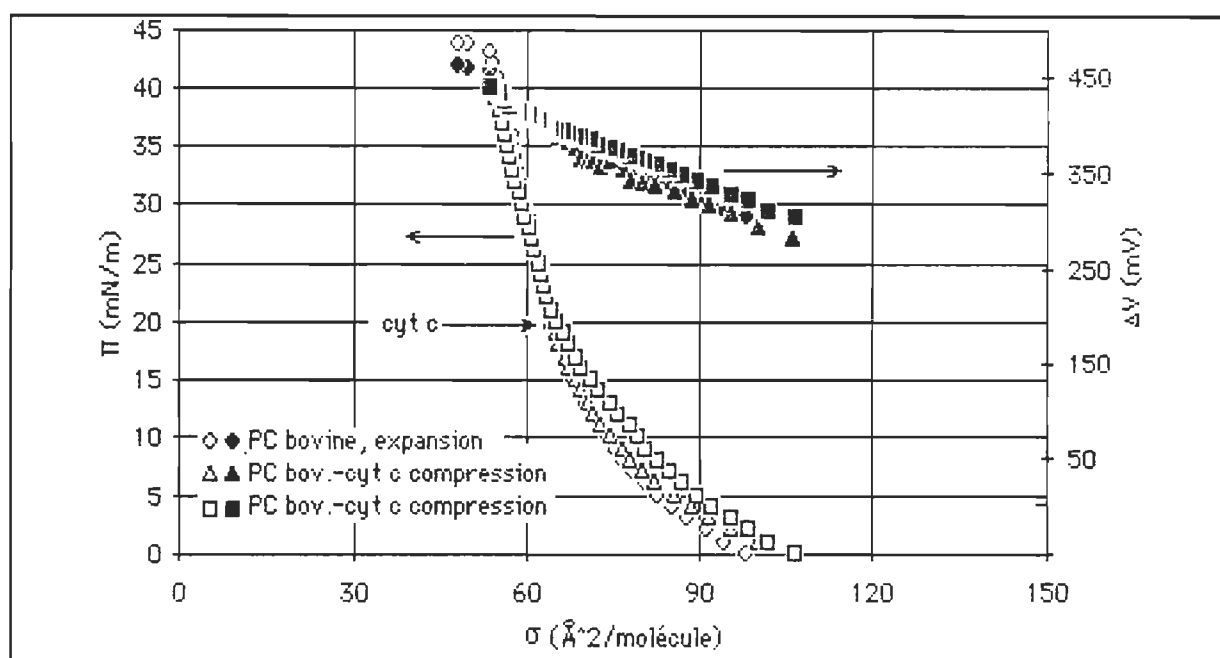


Figure 65. Isothermes Π - σ et ΔV - σ obtenues pour la PC bovine et pour le mélange PC bovine-cyt c. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles rapportées à la Fig. 62 sauf que la sous-phase contient 0,5 M de NaCl purifié par extraction au chloroforme.

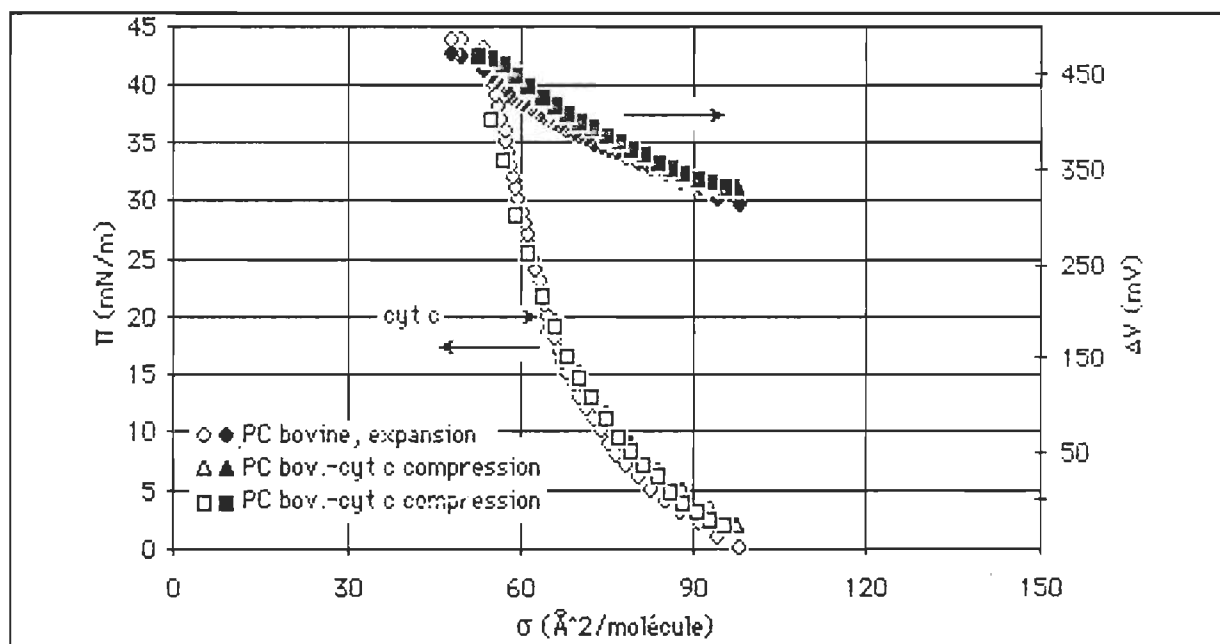


Figure 66. Isothermes Π - σ et ΔV - σ obtenues pour la PC bovine et pour le mélange PC bovine-cyt c. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles rapportées à la Fig. 62 sauf que la sous-phase contient 1,0 M de NaCl purifié par extraction au chloroforme.

Ces valeurs, de même que les énergies de stabilisation, sont présentées au Tableau 6.

Tableau 6

Effet de la force ionique de la sous-phase sur l'énergie de stabilisation du système PC bovine-cytochrome c

Conc. NaCl	n_r^H	ΔG_i	ΔG_e	ΔG_{sta}
M	<u>éq. résidu</u> lipide	<u>1 mol PC</u> mol éq. rés.	<u>1 mol PC</u> mol éq. rés.	<u>1 mol PC</u> mol éq. rés.
0	3,8	-156	392	236 ± 40
0,1	3,6	-96	410	314 ± 60
0,3	2,1	-57	449	392 ± 115
0,5	1,2	-151	475	324 ± 200
1,0	1,0	-	-	-

- résultat non-accessible

Le Tableau 6 présente certains paramètres calculés depuis les résultats montrés aux Figures 62 à 66. Le nombre de résidus fut calculé à partir du Δa mesuré au maximum de l'expansion selon le formalisme présenté au Chapitre 4. Les énergies libres d'incorporation et d'éjection ont été calculées en considérant les aires moléculaires présentées à la Figure 41. Pour des fins de comparaison, ces valeurs ont été rapportées par équivalent-résidu incorporé par lipide. Donc les énergies rapportées ne sont pas affectées par le fait que la quantité de protéine incorporée est moindre alors que la concentration de NaCl augmente. Les énergies libre de stabilisation présentées au Tableau 6 comprennent l'incertitude estimée en considérant une imprécision de l'isotherme de référence du lipide seul de $\pm 1 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$.

Lorsque la concentration de NaCl passe de 0 à 1,0 M, la concentration de protéine associée par lipide passe de 3,8 à 1,0 équivalent-résidu associés par lipide. Cette constatation est la première démonstration de la dépendance ionique de l'incorporation du cyt c dans une monocouche de PC bovine. Cette réduction de la quantité de protéine incorporée se fait importante alors que la concentration de NaCl dépasse 0,1 M. En augmentant cette concentration de 0,1 à 0,3 M, la décroissance de la quantité de cyt c incorporé dans une monocouche de PC passe de 5 à 45 %, comparativement à l'expérience menée sans NaCl. Quoique les incertitudes se font plus croissantes lorsque l'effet d'hystérèse est amoindri, il apparaît que l'énergie de stabilisation s'accroît lorsque la force ionique de la sous-phase est augmentée. Cette augmentation de l'énergie de stabilisation est causée par une augmentation simultanée des énergies d'incorporation et d'éjection. Cet effet se traduit plus particulièrement par l'abaissement de la pression maximale à laquelle le cyt c commence à s'incorporer lors de l'expansion. Il est possible de constater en référant aux Figures 62 et 63 que lors de l'expansion le décalage des isothermes Π - σ commence à se manifester à 12 mN m^{-1} lorsque la concentration de NaCl est nulle, alors que cette valeur est abaissée à 6 mN m^{-1} pour une concentration de 0,1 M. Comme la quantité de protéine incorporée n'est pas très différente, le cycle obtenu en compression est relativement identique dans les deux cas. La différence d'énergie de stabilisation entre les films mixtes présentes sur des sous-phases dépourvue de sel et contenant 0,1 M de NaCl s'explique par un gain moindre d'énergie lors de l'adsorption alors qu'il faut fournir un travail croissant pour désorber la protéine. D'une part, le fait que l'incorporation de la protéine se manifeste à des pressions de surface moindres laisse présager

qu'un moins grand nombre de molécules possèdent l'énergie nécessaire afin d'atteindre l'interface et d'interagir avec le lipide. Plus précisément, ce comportement peut être représentatif d'une plus forte stabilisation de la forme solubilisée du cytochrome c dans une sous-phase hypertonique. D'ailleurs, lors de son extraction, le cyt c est décroché des membranes avec une solution de rinçage de force ionique modérée. De plus, une fois incorporé dans la monocouche lipidique, l'énergie devant être fournie afin d'expulser le cytochrome c est plus grande.

Ce comportement peut, à prime abord, être surprenant puisque lorsqu'une interaction lipide-protéine est inhibée par l'augmentation de la force ionique du solvant, il est habituel de croire au caractère ionique de cette interaction. Dans le cas du système PC-cyt c, nous avons peine à croire qu'une interaction de si faible énergie puisse être ionique. Il suffit, pour s'en convaincre, de considérer qu'un pont hydrogène (interaction dipôle-dipôle) possède une énergie moyenne de 24 kJ mol^{-1} . Afin de conclure sur la nature de l'interaction qui prend place entre le cyt c et la PC, certaines données supplémentaires concernant l'influence de la force ionique sur la solubilité du cytochrome c apparaissent nécessaires. La littérature ne présente pas, à notre connaissance, de diagramme rapportant la solubilité du cytochrome c en fonction de la force ionique du solvant. C'est sans succès que nous avons tenté d'établir la solubilité maximale de la protéine; celle-ci est encore soluble à une concentration de 50 mg mL^{-1} . De plus, pour des concentrations de cet ordre, la quantité de cyt c solubilisé devient égale à la quantité de sel requis pour préparer la solution de NaCl 1 M! Ces conditions s'éloignent trop des conditions

expérimentales dans lesquelles furent obtenues les isothermes du mélange lipide-protéine. Nous avons finalement opté pour la chromatographie hydrophobe afin de vérifier la dépendance de la solubilité du cytochrome c en fonction de la concentration ionique de la sous-phase. Pour ce faire, nous avons simplement fabriqué une colonne de 1,5 x 10 cm d'octyl-Sépharose-CL 4B. Ce médium est un tamis moléculaire sur lequel sont branchées des chaînes octyles hydrophobes. Lorsqu'une solution de cyt c est appliquée sur un gel d'octyl-Sépharose préalablement rincé avec du tampon ne contenant pas de NaCl, l'échantillon demeure accroché au sommet de la colonne alors que l'élution est poursuivie avec du tampon ne contenant pas de sel. Ce comportement est la conséquence de la plus grande affinité du cytochrome c pour le support hydrophobe que pour la sous-phase alors que l'éluant ne contient pas de NaCl. Lorsque le tampon utilisé contient du NaCl à une concentration de 0,5 et 1,0 M, l'échantillon est immédiatement élué indiquant que l'affinité de la protéine pour le solvant aqueux est plus grande que pour le support hydrophobe alors que l'éluant contient du NaCl. Ce résultat est caractéristique du phénomène de "salting-in" identifié pour les protéines solubles à des concentrations modérées de sel. Pour le cyt c, ce processus est effectif jusqu'à des concentrations de 1M. Ce comportement explique que l'énergie d'adsorption du cytochrome c est supérieure alors que la sous-phase contient du NaCl. Le bilan des interactions protéine-solvant devient alors plus favorable que le bilan des interactions protéine-monocouche.

Une certaine ambiguïté est relevée dans la littérature en ce qui concerne l'influence des ions sur l'incorporation du cytochrome c dans une monocouche

de PC. Il est mentionné par Quinn et Dawson (1969b) que l'ajout de NaCl à une concentration finale de 1,0 M n'affecte aucunement les propriétés d'incorporation du cytochrome c sur des monocouches de PC extraite du jaune d'oeuf. Ce résultat est en complet désaccord avec nos résultats. De plus, il est rapporté par mesure de fluorescence que l'attachement du cytochrome c à des vésicules (Teissié et Baudras (1977)), ou des monocouches contenant de la PC (Teissié (1981)), peut être inversé à des concentrations de NaCl de 0,1M. Finalement, Das et Crane (1964), dans une étude traitant de la formation de complexes solubles de cytochrome c et de phospholipides, mentionnent que "l'addition de sel au mélange réactionnel empêche la formation du complexe soluble". Tous ces résultats portent à croire que l'insensibilité des ions sur l'attachement du cyt c à la PC rapportée par Quinn et Dawson (1969b) est le fruit d'un artefact. Nous décrivons à la Section 2.2 une méthode permettant la purification du NaCl pour son utilisation en monocouche. Des expériences préliminaires menées avec la système PC-cyt c sur des sous-phases contenant du NaCl non-purifié ne montraient pas d'éjection du cyt c, c'est même un accroissement de Δa qui était observé. Cet accroissement s'est avéré être la conséquence de l'incorporation des impuretés tensioactives présentes dans le sel. Ayant été confronté à ce problème, nous croyons que le comportement rapporté par Quinn et Dawson est du même ordre.

6.1.3 Concernant l'activité de surface du cytochrome c. Il fut mentionné à la Section 1.2.3 que certains auteurs suggèrent que l'activité de surface de plusieurs protéines est une conséquence de la distribution asymétrique des résidus non-polaires au sein des hélices- α . Il est rapporté par Krebs et Phillips

(1984) qu'il existe une relation linéaire entre la pression de surface mesurée à l'équilibre pour un film de protéine adsorbée à l'interface air-eau et le produit $\mu_H \cdot F$ où μ_H est le moment hydrophobe et F la fraction de la structure protéique organisée en hélice- α . Plus concrètement, le moment hydrophobe est défini par la relation:

$$\mu_H = \left[\left[\sum_{n=1}^N H_n \sin(\delta n) \right]^2 + \left[\sum_{n=1}^N H_n \cos(\delta n) \right]^2 \right]^{1/2} \quad (6.2)$$

où N est le nombre d'acides aminés présents dans une hélice- α donnée, H_n est l'indice d'hydrophobicité du résidu n et δn est la position angulaire du résidu n sur le cercle défini par la projection de l'hélice dans le plan normal à son axe de progression. Dans le cas de l'hélice- α , l'incrément angulaire $\delta=100^\circ$ par résidu puisqu'il y a 3,6 résidus par tour d'hélice. Ce concept est toutefois très simpliste puisqu'il prévoit que l'activité de surface d'une protéine n'est contrôlée que par une caractéristique propre à la protéine et ne dépend pas des particularités du substrat sur lequel se produit l'adsorption. De plus, il ne permet pas d'expliquer l'influence de certains facteurs externes sur la réversibilité de l'adsorption des protéines. Plus explicitement, le concept de moment hydrophobe ne prévoit pas que l'incorporation du cytochrome c dans des monocouches de PC est affectée par la force ionique du milieu, or nous avons montré que c'est le cas. Nous avons tout de même voulu vérifier l'applicabilité de cette théorie à l'activité de surface du cytochrome c sur des monocouches de PC.

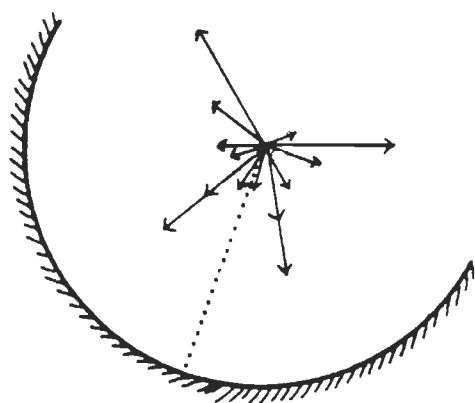
La Figure 67 rapporte les valeurs de μ_H et des hydrophobicités moyennes, \bar{H} , calculées pour les trois hélices- α du cytochrome c . Pour ce faire, nous avons

considéré l'échelle normalisée d'hydrophobicité de Janin (1979) citée par Eisenberg (1984). Les hydrophobicités furent calculées selon la relation:

$$\bar{H} = \frac{\sum_{n=0}^N H_n}{N} \quad (6.3)$$

où les termes H_n et N ont la même signification que dans l'Eq. 6.2. Nous avons indiqué sur cette figure la position de la protéine par rapport à la face de l'hélice- α , de même que la direction du moment hydrophobe. Il est important de mentionner que les valeurs de μ_H présentées dans cette figure, de même que les valeurs données à la Fig. 4, sont des valeurs moyennes exprimées par résidu présent au sein de l'hélice. En comparant les valeurs de \bar{H} et de μ_H présentées à la Fig. 67, nous pouvons tirer un certain nombre de conclusions. D'une part, les hélices- α du cytochrome c ne possèdent pas d'activité de surface telle que définie à la Fig. 4. Pour les trois hélices, les moments hydrophobes estimés (qui sont compris entre +0,14 et +0,45 par résidu) sont beaucoup trop faibles pour conférer une activité de surface à ces segments qui présentent un \bar{H} compris entre -0,28 et -0,78. Selon la définition incluse à la Figure 4, les hélices- α du cytochrome c présentent les caractéristiques rencontrées dans les protéines globulaires solubles qui n'ont pas d'activité de surface. D'autre part, les moments hydrophobes des hélices I et II pointent en direction du centre de la protéine alors que le μ_H de l'hélice III pointe en direction de la sous-phase. Ainsi, seule l'hélice III peut avoir une activité de surface sans que des changements structuraux importants surviennent.

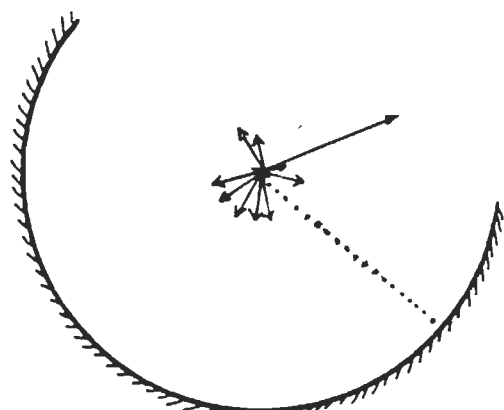
Dans sa définition actuelle, le moment hydrophobe ne permet pas d'attribuer une activité de surface au cytochrome c alors que nous avons mis



HELICE I (4-17)

$$\bar{H} = -0,36$$

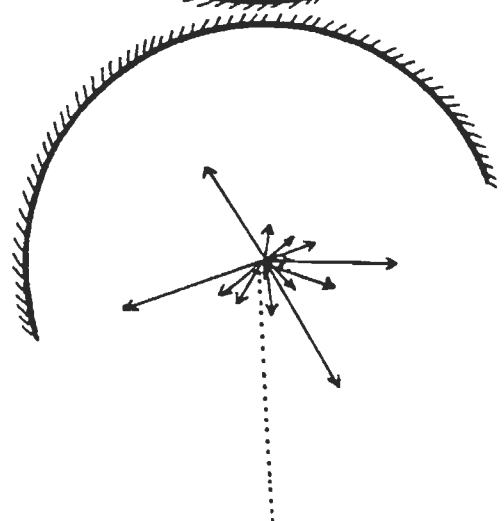
$$\mu_H = +0,45$$



HELICE II (58-69)

$$\bar{H} = -0,28$$

$$\mu_H = +0,14$$



HELICE III (88-101)

$$\bar{H} = -0,78$$

$$\mu_H = +0,23$$

Figure 67. Représentation vectorielle du moment hydrophobe des trois hélices- α du cytochrome c. La position de ces hélices fut établie en conformité avec les valeurs citées dans Rietveld et coll. (1985). Les valeurs de μ_H et \bar{H} furent calculées en conformité avec les Eqs. 6.2 et 6.3 en considérant l'échelle normalisée de Janin rapportée dans Eisenberg (1984). Les portions hachurées indiquent la portion de l'hélice qui fait face à la protéine. Les pointillés indiquent la position angulaire de μ_H .

en évidence un tel processus par la mesure des isothermes Π - σ , ΔV - σ et Γ - σ du mélange PC-cyt c. Cette différence entre la théorie et l'expérience met en relief la complexité des facteurs impliqués dans les interactions lipide-protéine et la nécessité de raffiner les concepts théoriques. Nous devons toutefois mentionner que le concept de moment hydrophobe parvient à fournir une explication raisonnable de l'activité de surface de la mélitine et de la bactériorhodopsine (Eisenberg (1984)).

6.1.4 Conclusion relative aux systèmes PC-cytochrome c. Nous avons montré que la pression de surface et la force ionique du milieu aqueux sont deux facteurs qui, indépendamment ou en conjonction, permettent un contrôle fin de l'attachement du cytochrome c à une monocouche de PC. Certes, ces paramètres furent déjà identifiés par d'autres études mais notre approche permet le calcul de l'énergie de stabilisation impliquée. Cette mesure est inédite et peut être effectuée pour tout système présentant une incorporation réversible d'une protéine sur un lipide. En particulier, il fut mis en évidence que l'ajout de NaCl dans la sous-phase augmente l'énergie d'adsorption du cytochrome c. Cet effet est la cause de la plus grande affinité de la protéine pour la sous-phase lorsque celle-ci contient des ions; c'est le "salting-in". De plus, la protéine qui parvient à s'incorporer dans le film de lipide possède une énergie de stabilisation plus élevée.

En plus du système PC bovine-cytochrome c, nous nous sommes intéressés à trois systèmes chlorophylle-protéine présentant une incidence

biologique: les systèmes chl a-stellacyanine, chl a-plastocyanine et chl a-cytochrome f.

6.2 Divers systèmes chlorophylle a-protéine

6.2.1 Le mélange chlorophylle a-stellacyanine. La stellacyanine est une glycoprotéine cuprique extraite du latex de *Rhus vernicefera*. La fonction réelle de cette protéine demeure inconnue. Cependant, comme la majorité des protéines cupriques, il est possible de lui soupçonner un rôle d'oxydo-réducteur. Il faut également mentionner que cette protéine présente certaines analogies avec la plastocyanine; protéine agissant comme transporteur électronique lors des processus primaires de la photosynthèse. Cette protéine, de poids moléculaire de 20 kD, est constituée à 40 % d'hydrates de carbone, ce qui lui confère une grande solubilité dans l'eau. Comme son caractère hydrophile en fait un candidat intéressant pour son utilisation en monocouche, nous avons voulu vérifier l'interaction de cette protéine avec une monocouche de chl a.

La Figure 68 présente les isothermes Π - σ et ΔV - σ obtenues pour le système mixte chl a-scy, alors que la protéine fut injectée sous une monocouche de chl a comprimée à 20 mN m⁻¹. Cette expérience fut menée alors que la sous-phase A) ne contenait pas de NaCl et B) contenait 0,5 M de NaCl. Il apparaît qu'en l'absence de NaCl dans le contenu de la sous-phase, la protéine s'incorpore légèrement dans la couche de chl a. Si nous comparons le comportement de ce système à celui du mélange chl a-cyt c, nous pouvons

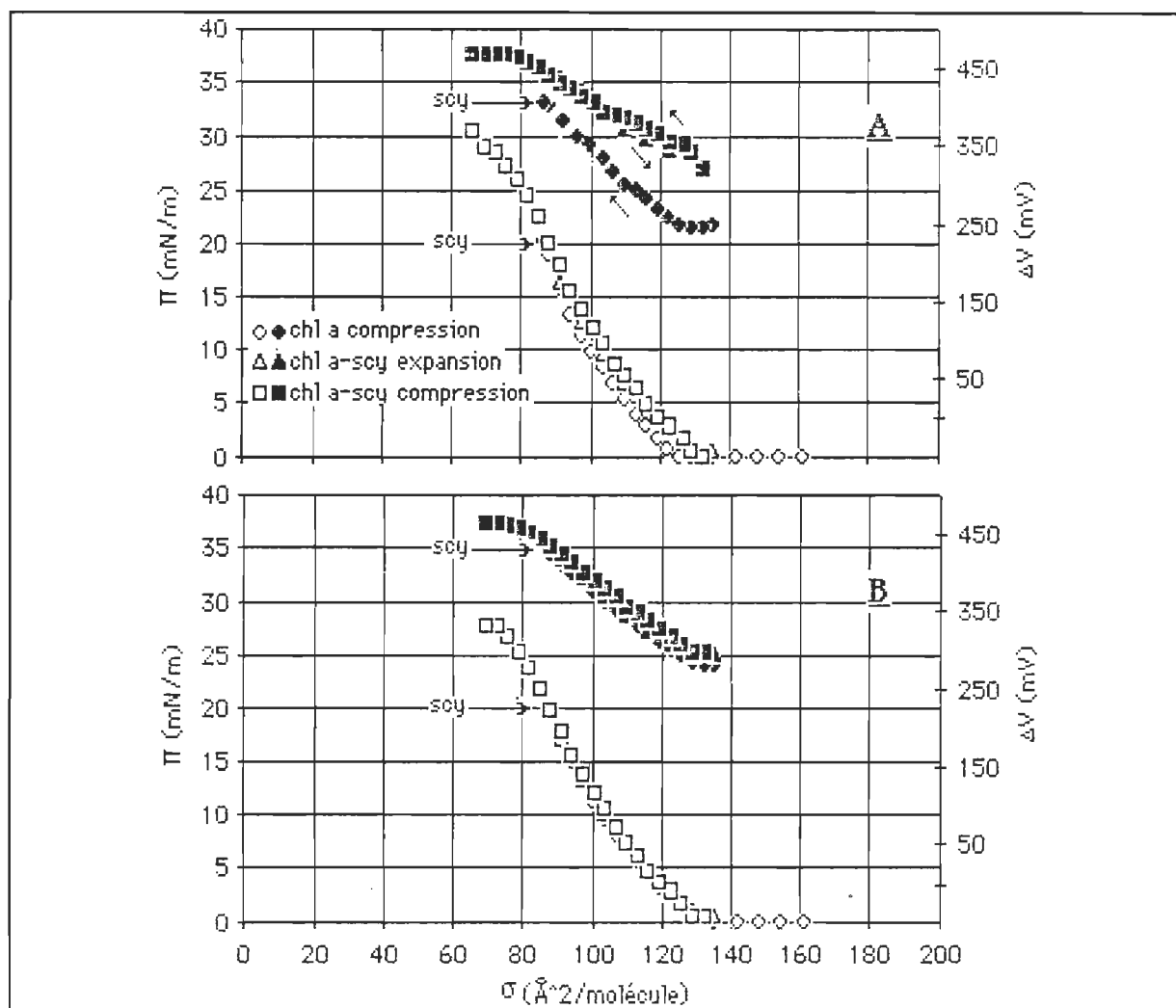


Figure 68. Isothermes Π - σ et ΔV - σ obtenues pour la chlorophylle *a* et pour le mélange chl *a*-stellacyanine. La protéine fut injectée sous la monocouche comprimée à 20 mN m⁻¹. Ces expériences furent faites sur des sous-phase A) ne contenant pas de NaCl et B) contenant 0,5 M de NaCl purifié par extraction au chloroforme. Sous-phase: Tampon Tris 10⁻³M, pH = 8,0. Température de 20±1°C. [scy] = 2,2 x 10⁻⁷M.

conclure que l'interaction entre les deux composés est très faible. L'ajout de NaCl à une concentration finale de 0,5 M ne fait que diminuer la quantité de protéine incorporée dans la monocouche. Le léger écart des isothermes observé en A) de même que l'accroissement du potentiel de surface suggèrent qu'il y a une légère incorporation de la protéine dans la monocouche. Les

changements spectroscopiques de films chl a-scy seront présentés et traités subséquemment.

6.2.2 Le mélange chlorophylle a-plastocyanine. La plastocyanine est une cuproprotéine de poids moléculaire de 10,5 kD (Scawen et coll. (1975)). La structure tridimensionnelle de cette protéine soluble fut résolue en 1978 par Colman et ses collaborateurs (1978) avec une résolution de 1,6 Å. Cette protéine, qui présente une forme ellipsoïdale, possède une dimension de 40 x 32 x 28 Å. Elle agit comme transporteur électronique entre deux entités membranaires: le cytochrome f, compris dans le complexe membranaire cytochrome b_6/f , et le P700 (Haehnel et coll. (1980)). Tout comme le cytochrome c, les aspects concernant le mode de diffusion et de fixation de cette protéine présentent un vif intérêt. La chlorophylle a étant une des composantes du P700, nous avons vérifié l'interaction entre la chlorophylle a et la plastocyanine.

La Figure 69 présente les isothermes Π - σ et ΔV - σ obtenues pour la chl a et le système binaire chl a-pcy alors que cette dernière fut injectée sous la monocouche comprimée à une pression de 20 mN m⁻¹. Ces expériences furent menées A) à 0 M et B) 0,5 M de NaCl dans la sous-phase. Suite à l'injection de la protéine dans la sous-phase en absence de sel, aucune des propriétés de surface n'est modifiée. Cependant, un léger décalage des isothermes est observé lors de l'expansion et de la compression. La différence d'aire entre les deux isothermes est maximale aux faibles pressions ($\Delta a_{\max}=10 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$) et s'amenuise au fur et à mesure que la pression de surface est accrue. Ce

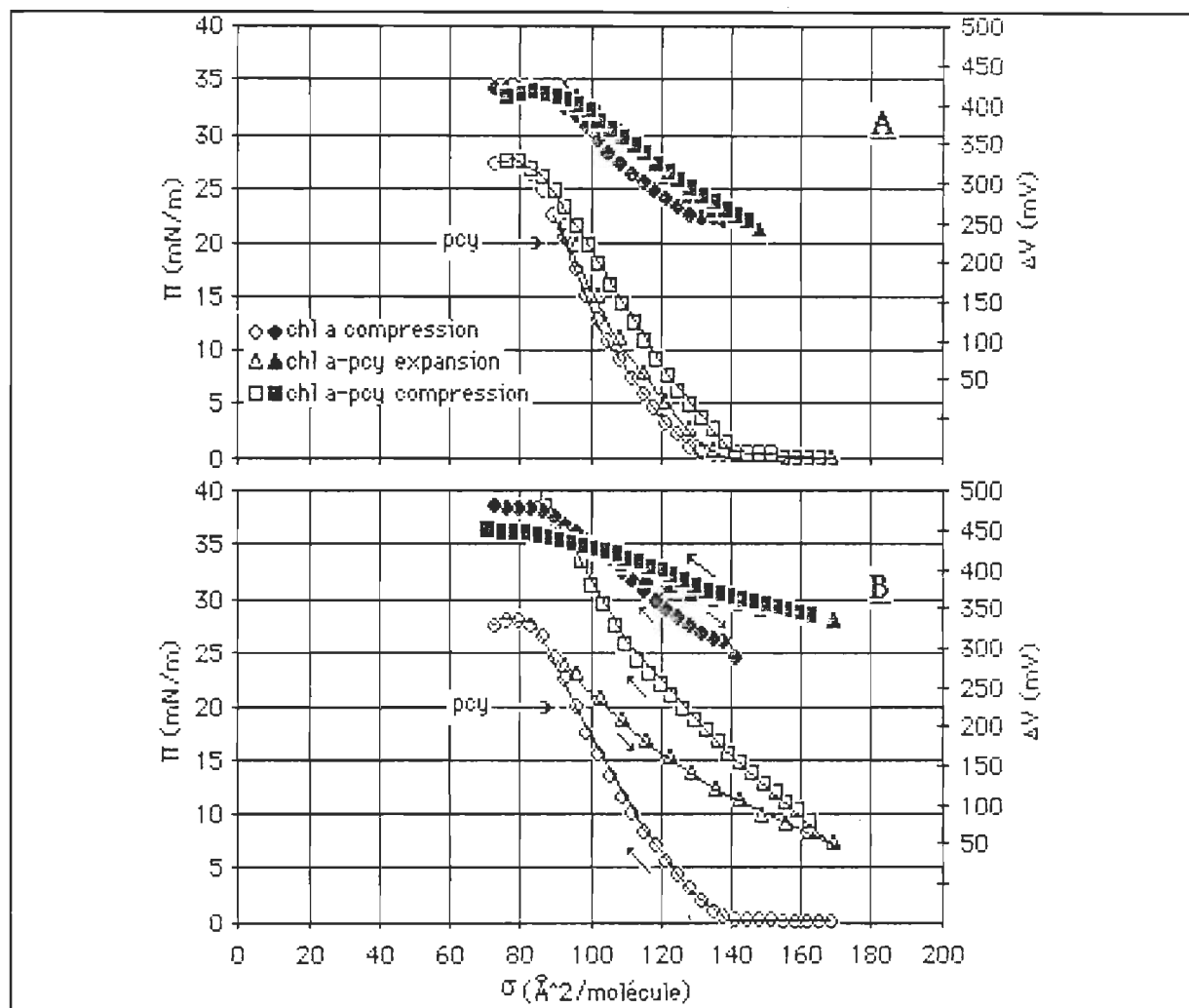


Figure 69. Isothermes Π - σ et ΔV - σ obtenues pour la chlorophylle *a* et pour le mélange chl *a*-plastocyanine. La protéine fut injectée sous la monocouche comprimée à 20 mN m^{-1} . Ces expériences furent faites sur des sous-phase A) ne contenant pas de NaCl et B) contenant $0,5 \text{ M}$ de NaCl purifié par extraction au chloroforme. Sous-phase: Tampon Tris 10^{-3} M , pH $-8,0$. Température de $20 \pm 1^\circ \text{C}$. $[\text{pcy}] = 2,7 \times 10^{-7} \text{ M}$.

comportement est similaire à celui observé pour le système chl *a*-scy sauf que l'isotherme ΔV - σ est moins grandement altérée dans le cas de la plastocyanine. Cette différence peut traduire un moment dipolaire plus élevé de la stellacyanine comparativement à la plastocyanine. Le collapse du film mixte

est le même que celui mesuré pour la chl a seule. L'addition de NaCl à la sous-phase a un effet important puisque le comportement du système est fort différent. Comme il est possible de constater à la Figure 69B, le système chl a-pcy étudié sur une sous-phase contenant 0,5 M de NaCl présente plusieurs analogies avec le système chl a-cyt c. Premièrement, il se produit une forte incorporation de pcy dans la monocouche de chl a décomprimée. Cette incorporation se fait d'autant plus importante que la pression de surface diminue. Lors de la phase compression, l'isotherme Π - σ du mélange chl a-pcy est en tout point distincte de celle mesurée pour la chl a. Cette différence, combinée à la disparition du collapse et de la faible compressibilité du film au-delà de 30 mN m^{-1} , confirme l'analogie entre les deux systèmes. L'interaction faible mesurée entre les deux composés en absence de NaCl dans la sous-phase se transforme en interaction forte alors que 0,5 M de NaCl est ajouté à la solution.

Deux liens peuvent être faits entre l'effet de la force ionique sur la fixation de la pcy sur une monocouche de chl a et les résultats rapportés dans la littérature. En immobilisant la pcy et le cyt f sur des tamis moléculaires, Khristin (1983) rapporte que le taux de fixation de la pcy sur les gels de Sépharose et Séphadex G-200 augmente de 60% en présence d'une concentration de 0,9 à 1,0 M de NaCl. L'auteur suggère deux interactions spécifiques afin d'expliquer ce comportement soit, l'interaction entre les groupements carboxyles du gel et la portion N-terminale de la protéine, et la participation des groupements hydrophobes de la protéine. Le dernier type d'interaction pourrait se produire au niveau des thylacoïdes alors que la

concentration ionique au voisinage de la pcy change. Cette fixation modulée par l'accroissement de la force ionique est suggérée par la forte dépendance ionique de l'interaction naturelle entre la plastocyanine et le P700. La réduction du P700⁺ par la plastocyanine augmente de 15 fois alors que la concentration de MgCl₂ passe de 0 à 0,2 M (Takabe et coll. (1983)). En présence de NaCl, quoiqu'existant, cet effet est dix fois moins marqué. Ce phénomène est expliqué par un masquage des charges négatives que présentent la membrane et la protéine (Burkey et Gross (1981)). Il est cependant possible de croire à un changement structural de la protéine.

Pour le système chl a-pcy, le modèle des monocouches présente deux imperfections principales. D'une part, il décrit l'interaction entre la pcy et la chl a, alors que la pcy agit au niveau d'une entité membranaire plus complexe, soit le P700. D'autre part, il est peu probable que le NaCl ait une incidence biologique réelle car ce sont les ions bivalents tel le Mg²⁺ qui ont une incidence biologique réelle. Cependant, nous avons mis en évidence une stimulation ionique de l'interaction entre la chl a et la plastocyanine. Cette dépendance ionique, qui est observée "in vivo", peut provenir de la modification de la structure ou des charges de surface de la pcy, ce qui favorise son interaction avec la chl a. Ce processus peut avoir une incidence biologique réelle si la chlorophylle est accessible à la surface de la membrane. Nous tenterons ultérieurement d'identifier les facteurs structuraux qui peuvent conduire à ces interactions.

6.2.3 Le mélange chlorophylle a-cytochrome f. Les isothermes Π - σ et ΔV - σ obtenues pour la chl a et le mélange chl a-cyt f sont présentées à la Fig. 70.

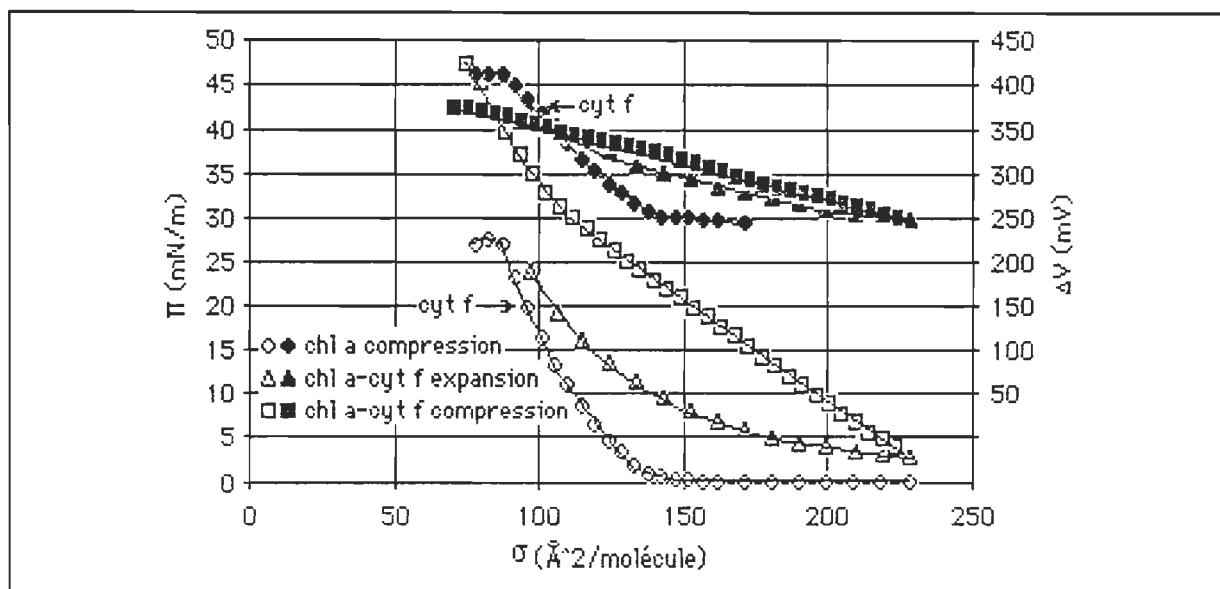


Figure 70. Isothermes Π - σ et ΔV - σ obtenues pour la chlorophylle a et pour le mélange chl a-cytochrome f. La protéine fut injectée sous la monocouche comprimée à 20 mN m^{-1} . Sous-phase: Tampon Tris 10^{-3}M , pH = 8,0. Température de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. $[\text{cyt f}] = 2,3 \times 10^{-7}\text{M}$.

Tout comme le mélange chl a-cyt c, la pression de surface s'accroît immédiatement après l'addition du cyt f au système. Ce comportement, qui traduit l'incorporation spontanée de la protéine dans le film de chl a ne se fait cependant pas sentir au niveau du potentiel de surface. C'est en fait une diminution moyenne de 10 mV qui est notée suite à l'injection de la protéine et l'homogénéisation de la sous-phase. Cet écart mesuré est cependant inférieur à la fluctuation de 15 mV notée sur les mesures de potentiel de surface des corps purs. Il apparaît clairement que suite à l'expansion du film mixte, autant l'isotherme de pression que de potentiel de surface demeure différente de celle mesurée pour la chl a seule. De plus, la première décompression ne peut être retrouvée lors des expansions ultérieures. Tout

comme pour le mélange chl a-cyt c, un nouveau film est formé suite à l'incorporation du cyt f dans une monocouche de chl a. Ce film, également très visqueux, présente la formation de filaments verts à forte pression de surface.

La différence du comportement des isothermes $\Delta V-\sigma$ notée entre les systèmes chl a-cyt c et chl a-cyt f peut être la cause d'une différence de la distribution des charges au sein des deux protéines. Cette supposition est en accord avec une étude rapportant qu'à un pH de 8,0 et une pression de surface de 6 mN m^{-1} , le cyt c possède un potentiel de surface supérieur de 40 mV à celui du cyt f (Chin et Brody (1975)).

Les spectres d'absorption de monocouches de ces systèmes mixtes furent mesurés. Ces résultats sont présentés à la section suivante.

6.2.4 Propriétés d'absorption des films de chlorophylle a et des mélanges chlorophylle-protéine. Nous avons présenté à la Section 5 les différences observées entre les spectres d'absorption mesurés pour la chl a seule et le mélange chl a-cyt c. L'effet majeur noté, soit le déplacement hypsochromique du maximum d'absorption de la chlorophylle, suggère une dilution de la chl a par le cyt c. Ce résultat, de même que les résultats obtenus pour les systèmes chl a-scy, chl a-pcy et chl a-cyt f sont résumés au Tableau 7.

Deux commentaires s'imposent concernant les données présentées au Tableau 7. Premièrement, la précision des valeurs citées pour la chl a pure et le mélange chl a-cyt c est dix fois supérieure aux valeurs citées pour les systèmes chl a-scy, chl a-pcy et chl a-cyt f. Cet état de fait est dû à

l'utilisation, dans le cas de la chl a et du mélange chl a-cyt c, d'un système d'acquisition et de traitement informatique des spectres. Dans les autres cas, ces opérations durent être faites "manuellement". En second lieu, les valeurs rapportées pour le système chl a-psy en présence de NaCl 0,5 M ne comportent que le maximum d'absorption dans le rouge; les autres données sont inaccessibles étant donné la trop forte diffusion lumineuse provoquée par la présence d'un mince film de NaCl solide sur la lame.

Tableau 7

Comparaison des propriétés d'absorption de la chlorophylle a et des mélanges chlorophylle a-protéine déposés* sur des lames de quartz par la méthode de Langmuir-Blodgett à une pression de surface de 20 mN m⁻¹

Description	$\lambda_{\text{max rouge}}$ (nm)	<u>I max rouge</u> monocouche	$\lambda_{\text{max bleu}}$ (nm)	<u>I max bleu</u> monocouche
chl a	680	0,0108	439	0,0135
chl a-cyt c	673	0,0077	436	0,0108
chl a-scy	676	0,010	437	0,013
chl a-psy	676	0,011	437	0,014
(+NaCl)	670	-	-	-
chl a-cyt f	674	0,008	437	0,011

-donnée non-accessible car la lame diffuse (présence de NaCl solide)

*Sauf pour le système chl a-cyt f, les rapports de déposition sont compris entre 0,9 et 1,0. Dans le cas du système chl a-cyt f, le rapport de déposition n'est que de 0,70-0,75.

Il est un peu surprenant de constater que les mélanges qui ne présentent pas d'interactions fortes, c'est-à-dire les systèmes chl a-scy et chl a-psy (0 M NaCl) présentent un déplacement hypsochromique. Quoique l'intensité d'absorption par monocouche de chl a ne soit pas grandement affectée, ce déplacement doit traduire une incorporation de la protéine ou une modification de la structure de la chl a médiée par ces protéines. Il n'est

cependant pas impossible qu'un artefact provenant de la procédure de déposition soit en cause. Lors de la déposition sur support solide hydrophile, le film ne se dépose que lors de la remontée. Lors de la descente, si elle présente une affinité suffisante pour le substrat hydrophile, la protéine peut s'adsorber sur celui-ci. Ainsi, nous avons observé que lorsque nous effectuons la déposition d'une monocouche de chl a sur une lame où nous avons préalablement laissé s'adsorber du cytochrome c, le déplacement hypsochromique est observé. Il est possible que cet effet ait un rôle à jouer dans le cas des systèmes chl a-scy et chl a-pcy (0M NaCl). Malgré l'imprécision de la mesure et l'effet perturbateur de la couche solide de sel sur la lame, le système chl a-pcy présente un déplacement hypsochromique plus important en présence de sel. Cette condition est celle où les deux composants présentent un maximum d'interaction. Dans le cas du système mixte chl a-cyt f, il est surprenant de constater que l'intensité d'absorption par monocouche ne soit diminuée que de 7% alors que l'isotherme présenté à la Figure 70 montre une augmentation de 33% de l'aire occupée par la chlorophylle, lorsqu'associée au cytochrome f. Toutefois, il faut prendre en considération les rapports de déposition plus faibles obtenus pour ces lames.

En fait, cette série de résultats nous confronte aux problèmes bien réels inhérents au transfert des films par la méthode de Langmuir-Blodgett. Certes, nous pouvons constater que l'incorporation des protéines dans des films de chl a apporté des modifications aux propriétés d'absorption de la chl a, cependant, l'interprétation de ces modifications est limitée par les faiblesses de la technique. En l'occurrence, nous ne pouvons être absolument certains que la

solution de protéine ne s'adsorbe pas sur la lame et que le transfert sur un support solide n'influence pas l'organisation des molécules. Nous ne pouvons négliger les interactions entre la monocouche et le substrat. N'avons nous pas mentionné que, dans le cas du mélange chlorophylle a-cytochrome c, l'attachement du film mixte au support est si fort qu'il faut gratter la surface de la lame avec une spatule afin de le décrocher? Il est impossible de négliger l'éventuelle influence de l'interaction film-substrat pour un tel système. Les données spectroscopiques obtenues suite au transfert des films mixtes chl-protéine nous apparaissent donc des indications de la force de l'interaction. Les propriétés optiques de ces systèmes demandent à être caractérisées directement à l'interface air-eau afin de donner une interprétation quantitative complète. Cette mesure ne nous fut pas accessible.

6.2.5 Les facteurs pouvant moduler l'interaction chlorophylle-protéine.

Nous avons caractérisé certains systèmes chlorophylle-protéine présentant des comportements distincts. Le système chl a-scy présente peu ou pas d'interactions avec la chl a. Le système chl a-pcy présente une forte interaction avec la chl a alors que du NaCl est ajouté à une concentration de 0,5 M dans la sous-phase; cette même interaction est faible alors que la sous-phase est dépourvue de sel. Le système chl a-cyt c tout comme le système chl a-cyt f présente une forte interaction entre les deux composants. Quels sont les facteurs qui modulent la spécificité de ces interactions? Nos résultats permettent-ils d'identifier des points communs entre les protéines présentant une forte affinité vis-à-vis de la chlorophylle?

Premièrement, ces résultats nous permettent d'affirmer que toutes les protéines et tous les polypeptides ne présentent pas la particularité d'interagir avec la chl a. Notamment, cette affirmation est confirmée par l'absence d'interactions que nous avons mesurée pour les systèmes chl a-polyasparagine, chl a-polylysine et chl a-poly acide aspartique. Les résultats obtenus pour le système chl a-scy sont du même ordre. Afin d'identifier d'éventuels facteurs de la structure primaire, secondaire ou tertiaire de ces protéines qui peuvent expliquer la spécificité de l'interaction chlorophylle-protéine, nous allons successivement comparer les divers niveaux de structure du cytochrome c, de la stellacyanine, de la plastocyanine et du cytochrome f.

6.2.5.1 La structure primaire des quatre protéines utilisées. La séquence d'acides aminés des quatre protéines que nous avons utilisées sont présentées à l'Annexe C. Déjà nous pouvons avoir la conviction que la structure primaire d'une protéine ne peut être le seul facteur responsable de l'interaction chlorophylle-protéine; la spécificité de l'interaction entre la pcy et la chlorophylle a médiée par le contenu ionique de la sous-phase en est la preuve. Cependant, nous tenterons de mettre en relief la possibilité qu'ont certains acides aminés d'interagir avec la chlorophylle. Cette comparaison est permise puisque les quatre systèmes rapportés ont été caractérisés dans des conditions similaires. Si, indistinctement de la dépendance du contenu ionique de la sous-phase, nous considérons la gradation d'interaction chlorophylle-protéine suivante, cyt f > pcy > cyt c > scy, pouvons-nous mettre en relief un rapport entre le contenu en un ou plusieurs acides aminés des protéines et cette gradation? Le Tableau 8 résume le contenu global en acides aminés des

quatre protéines. Il est à noter que pour les raisons abordées à la Section 2.1.2, nous avons négligé la section du cyt f qui comprend les résidus 250 à 285.

Tableau 8

Composition en acides aminés du cytochrome f, de la plastocyanine, du cytochrome c et de la stellacyanine*

acide aminé	cytochrome f	plastocyanine	cytochrome c	stellacyanine*
LYS	17	6	19	10
ARG	9	0	2	3
GLU	15	9	9	0
GLN	12	1	3	4
ASP	12	6	3	9
ASN	14	5	5	7
TYR	9	3	4	8
PRO	24	5	4	3
THR	9	5	10	9
SER	13	7	0	4
HIS	2	2	3	4
GLY	24	13	12	8
ALA	15	7	6	3
TRP	0	0	1	2
MET	1	2	2	0
PHE	7	6	4	5
LEU	20	7	6	3
VAL	23	11	3	13
ILE	21	3	6	5
CYS	2	1	2	3
Total	249	99	104	103/107

* Une certaine confusion existe dans la littérature concernant la composition exacte de la stellacyanine. Nous avons calculé la composition présentée depuis la séquence donnée dans Bergman et coll. (1977).

Nous ferons avant tout deux commentaires sur les données présentées au Tableau 8. En premier lieu, nous n'avons pas considéré la section regroupant les acides aminés 250 à 285 du cytochrome f. Comme nous l'avons mentionné précédemment, ce segment est excisé lors des étapes de purification. C'est

d'ailleurs cette modification qui confère au cytochrome f utilisé son hydrosolubilité. Deuxièmement, la séquence analysée est celle du cytochrome f du pois alors que le cytochrome f que nous avons utilisé provient du navet. Quoique la séquence du cytochrome f du navet ne soit pas présentement élucidée, nous avons tout de même effectué la comparaison. Il est d'ailleurs mentionné qu'il existe un fort taux d'homologie entre les séquences du cyt f provenant de diverses sources (Willey et coll. (1984)). Troisièmement, nous constatons une certaine ambiguïté dans la littérature concernant la séquence de la stellacyanine. Dans l'article que nous avons utilisé, Bergman et coll. (1977) rapportent que la stellacyanine ne contient ni glutamine, ni asparagine, alors que la structure présentée comporte quatre résidus de glutamine et sept résidus d'asparagine! Nous avons d'ailleurs relevé d'autres différences entre la composition globale citée dans le texte et celle présentée dans la séquence. Pour cette raison, nous avons calculé la composition depuis la séquence rapportée dans la figure. Celle-ci comprend 103 des 107 acides aminés composant la protéine.

Le seul acide aminé retrouvé dans ces quatre protéines qui coïncide avec l'échelle de gradation de l'interaction chlorophylle-protéine présentée précédemment est l'acide glutamique. Cependant, la stellacyanine contient neuf résidus d'acide glutamique, cousin proche de l'acide aspartique, ne différent que d'un groupement méthyle. A la lueur des résultats obtenus, il est impossible de statuer qu'un ou plusieurs acides aminés sont responsables de la spécificité de l'interaction chlorophylle-protéine.

6.2.5.2 Les structures secondaires et tertiaires des protéines utilisées.

Parmi les raisons qui ont guidé le choix de ces protéines, le critère de solubilité en fut un d'importance. Nous avons voulu que les effets mesurés soient la manifestation d'interactions chlorophylle-protéine ou lipide-protéine, non pas le reflet de l'affinité des protéines pour l'interface air-eau. Trois des protéines que nous avons utilisées sont naturellement hydrosolubles et la quatrième est rendue soluble par excision d'une portion transmembranaire. Ces protéines globulaires hydrosolubles sont généralement structurées afin de maximiser les interactions entre les groupements polaires, d'une part, et de maximiser le contact entre les groupements hydrophobes, d'autre part. La structure tridimensionnelle exacte de ces protéines n'est connue que pour le cytochrome c (Dickerson (1972)) et la plastocyanine (Colman et coll. (1978)).

Même si ces quatre protéines présentent des propriétés de protéines hydrosolubles, nous avons désiré vérifier plus finement si la polarité de ces polypeptides peut être un facteur régissant la spécificité des interactions chlorophylle-protéine. Comme la technique que nous avons utilisée permet d'identifier globalement l'affinité de ces différents couples chlorophylle-protéine, il est intéressant de classer ces protéines selon un indice global de polarité. L'indice d'hydrophobicité défini à l'Eq. 6.3 constitue une base de comparaison intéressante. Nous avons calculé les indices d'hydrophobicité moyens du cyt c, du cyt f, de la scy et de la pcy en utilisant l'Eq.6.3 et en considérant les séquences citées à l'Annexe C. Pour ce faire, nous avons considéré l'échelle normalisée de Janin (Eisenberg (1984)) qui offre l'avantage d'avoir été établie pour les protéines globulaires hydrosolubles. Ces valeurs, de

même que l'indice calculé pour la portion transmembranaire du cyt f, sont présentées au Tableau 9.

Tableau 9

Comparaison entre les indices d'hydrophobicité du cytochrome f, de la plastocyanine, du cytochrome c et de la stellacyanine. Les valeurs furent calculées en considérant les compositions présentées au Tableau 8 et en utilisant l'échelle normalisée de Janin (1979)

cytochrome f		plastocyanine	cytochrome c	stellacyanine
<u>résidus 0-249</u>	<u>résidus 250-270</u>			
-0,04	0,68	0,08	-0,32	-0,12

Plus les valeurs présentées au Tableau 9 sont négatives, plus la protéine considérée est hydrophile. Inversement, plus l'indice d'hydrophobicité est positif, plus la protéine est hydrophobe. Il est ainsi possible de constater que la plus hydrophile des protéines répertoriées est le cytochrome c. A l'autre extrême, la section transmembranaire du cytochrome f, donnée à titre comparatif, présente un indice d'hydrophobicité fortement positif. Il est intéressant de constater que le cyt f dépourvu de ce segment présente un indice d'hydrophobicité inférieur à celui de la plastocyanine et supérieur à la stellacyanine. Puisque le calcul de l'indice d'hydrophobicité de la stellacyanine ne tient pas compte du fort pourcentage en poids d'hydrates de carbone que contient cette protéine, son indice d'hydrophobicité est surévalué. En utilisant les indices d'hydrophobicité présentés au Tableau 9, nous pouvons classer les protéines par ordre croissant d'hydrophobicité de la façon suivante: cyt c > scy > cyt f > pcy. Cette gradation ne permet pas d'expliquer que la force des

interactions chlorophylle-protéine est simplement gouvernée par l'hydrophobicité des polypeptides.

Nous sommes présentement confrontés à la faiblesse de la technique des monocouches à identifier spécifiquement la nature des interactions mesurées. Cette technique permet, comme nous l'avons montré, de mettre en évidence des interactions fortes et faibles. Cependant, il est impossible d'identifier spécifiquement, tel que nous avons tenté de le faire, les facteurs responsables de la force de ces interactions. Afin de caractériser plus précisément les facteurs qui gouvernent ces interactions, il apparaît nécessaire d'avoir recours à des techniques spectroscopiques spécifiques telle la spectroscopie infra-rouge. Idéalement, il faudrait être capable d'effectuer ces mesures directement à l'interface air-eau afin de contourner les problèmes inhérents à la déposition sur un substrat solide. L'utilisation de cette technique permettrait d'obtenir des informations sur la structure secondaire de la protéine et d'identifier le couplage ou non de certains groupements fonctionnels. Une telle étude constitue la suite logique du présent travail.

CHAPITRE 7

CONCLUSION

Par ce travail, nous avons montré l'utilité de la technique des monocouches afin de mesurer la force des interactions entre des protéines solubles et des monocouches insolubles dans la sous-phase. La particularité de l'approche que nous avons utilisée consiste à mesurer les isothermes de pression, de potentiel et de radioactivité de surface du système mixte soumis à des cycles expansion-compression opérés depuis des fortes pressions de surface. L'interaction faible entre les deux composés se traduit par une incorporation de la protéine réversible et dépendante de la pression de surface. Ces systèmes montrent des hystérèses dont l'amplitude grandit au fur et à mesure que la pression minimale d'expansion décroît. Ce comportement correspond à une incorporation grandissante alors que la pression de surface décroît. Les systèmes binaires qui présentent une forte interaction sont caractérisés par l'irréversibilité de l'incorporation de la protéine dans la monocouche; seule la première expansion présente un comportement distinct, les compressions et expansions subséquentes donnent des isothermes identiques. La différence notée pour la première expansion correspond à un mécanisme permettant de maximiser les interactions de contact entre les deux composés. Une fois les liens établis et stabilisés, le comportement interfacial du mélange est distinct de celui observé pour la monocouche insoluble seule, et ce peu importe l'état de compression du mélange. Cette irréversibilité de

l'incorporation dénote une forte stabilisation de la protéine dans la monocouche.

Afin de vérifier l'applicabilité de la loi d'additivité, nous avons déterminé les propriétés interfaciales de films de protéines déposés à partir de cristaux, d'une solution éthanol:eau ou simplement adsorbés depuis la sous-phase. Seules les aires moléculaires obtenues par déposition dans une solution éthanol:eau (2:1, v:v) donnent des isothermes Π - σ reproductibles. La déposition cristalline donne des aires moléculaires six fois moindres que celles mesurées pour la déposition dans la solution éthanol:eau. Lorsque la pression de surface est prise comme point de comparaison, la relation entre Π - ΔV et Π - $\delta\Delta$ est la même montrant que la nature des films formés ne dépend pas de la méthode de déposition, seule la quantité de matériel demeurant à l'interface varie. Les films de protéine se comportent de façon élastique entre 0 et 8 mN m⁻¹. Le comportement inélastique observé entre 8 et 20 mN m⁻¹ suggère qu'il se produit une éjection graduelle de la protéine composant le film.

Nous avons montré en combinant les isothermes Π - σ et Γ - σ obtenues pour le système PC(18:1)-cyt c qu'il est possible d'estimer la quantité de protéine associée à chaque lipide en évaluant Δa et en référant à l'isotherme Π - σ obtenue pour le cyt c déposé dans la solution éthanol:eau. La quantité de protéine associée par lipide croît lorsque le système atteint des pressions de surface décroissantes. L'expulsion graduelle et complète du cytochrome c se produit entre 14 et 23 mN m⁻¹. L'augmentation de la pression minimale d'expulsion de la protéine de 8 mN m⁻¹ (pour une monocouche pure de

protéine) à 14 mN m^{-1} (pour le système PC(18:1)-cyt c) est une conséquence de la stabilisation de la protéine dans la monocouche. Nous avons établi un formalisme permettant de quantifier cette énergie de stabilisation à partir des isothermes Π - σ obtenues pour le mélange lipide-protéine. Cette approche inédite nous permet d'estimer à $250 \text{ J mol lipide (mol éq.résidus)}^{-1}$, l'énergie d'interaction entre le cyt c et la PC(18:1). Des expériences menées avec le système PC bovine-cyt c donnent des énergies équivalentes, quoique ce lipide possède un indice d'insaturation moins élevé que la PC(18:1). Lorsque l'énergie de stabilisation est traduite en énergie hydrophobe, elle correspond au transfert, pour chaque protéine, d'une surface de 250 \AA^2 . Cette faible interaction permet d'estimer les potentiels de surface du mélange comme la somme des potentiels de surface des corps purs. Cette procédure inédite d'évaluation de l'énergie de stabilisation d'une protéine dans une monocouche peut être appliquée à tout système lipide-protéine qui présente une incorporation réversible. Les systèmes dipalmitoylphosphatidylcholine-albumine sérique humaine (Taneva et coll. (1984)) et phosphatidylglycérol-cardiotoxine IV (Bougis et coll. (1987)) sont des candidats idéaux pour une telle étude.

Cette approche nous a également permis de montrer que l'ajout, dans la sous-phase, de NaCl à une concentration finale de $1,0 \text{ M}$ annihile presque entièrement l'incorporation du cyt c dans une monocouche de PC bovine. Nous avons également mis en évidence qu'en même temps que la quantité de protéine décroît l'énergie de stabilisation de la protéine adsorbée est accrue. Cette augmentation de ΔG_{sta} est provoquée par une augmentation

conjointe des énergies d'incorporation et d'expulsion de la protéine. Par chromatographie hydrophobe, nous avons constaté qu'effectivement l'affinité du cyt c pour le milieu aqueux est accrue en présence de NaCl. La raison de l'augmentation de l'énergie d'expulsion demeure cependant inexpliquée.

Une forte interaction prenant place entre la chlorophylle a et le cytochrome c fut identifiée. Tel qu'il fut montré précédemment, cette interaction est principalement caractérisée par l'irréversibilité de l'incorporation de la protéine dans la monocouche de chl a. Après la première expansion, le nombre d'équivalents-résidus associés par chlorophylle demeure relativement constant, peu importe la pression de surface à laquelle nous soumettons le film. La loi d'additivité est impuissante à décrire les différences d'aires moléculaires aussi bien que les potentiels de surface d'un tel système. Nous mettons également en évidence qu'une structuration tridimensionnelle du mélange se produit lorsque celui-ci est comprimé au delà de 50 mN m^{-1} . Il est alors possible de recueillir un solide pigmenté qui apparaît virtuellement insoluble, aussi bien dans les solvants polaires que non-polaires.

En combinant les résultats obtenus pour le système chl a-cyt c et ceux obtenus pour les systèmes chl a-scy, chl a-pcy et chl a-cyt f, nous avons mis en évidence que les interactions chlorophylle-protéine sont spécifiques. Il est entre autre possible de moduler ces interactions en ajoutant des ions au contenu de la sous-phase. Cet effet peut être la cause d'un changement de structure de la protéine ou d'un masquage des charges de surface présentes sur la plastocyanine. Tous ces systèmes présentent, dans des conditions

identiques de déposition, des déplacements hypsochromiques du maximum d'absorption dans le bleu de la chlorophylle a. Ce comportement est en accord avec une dilution de la chl a par la protéine. Cependant, nous croyons que l'acquisition des spectres directement à l'interface air-eau est nécessaire afin de s'assurer que ce déplacement hypsochromique n'est pas provoqué par l'adsorption de la protéine sur la lame de quartz.

Le résultat obtenu pour le système chlorophylle a-plastocyanine présente un certain intérêt puisque la plastocyanine possède un rôle de transporteur électronique entre le cytochrome f et le P700. Ainsi, en présence d'ions dans le milieu aqueux, la plastocyanine présente une forte interaction avec la chlorophylle a, un des constituants du P700. Il a d'ailleurs été observé que l'interaction entre la plastocyanine était favorisée en présence d'ions.

Le résultat obtenu pour le système chlorophylle a-cytochrome f présente une incidence indirecte. Nous avons identifié que le cytochrome f interagit fortement avec la chlorophylle a. Il s'avère que "in vivo", la chlorophylle a ne se fixe pas au cytochrome f mais se retrouve plutôt accrochée à des polypeptides transmembranaires. Comme le cytochrome f est une protéine polaire ancrée à la surface de la membrane des thylacoïdes par un segment transmembranaire hydrophobe, il semble donc que la partie hydrosoluble du cyt f et la chlorophylle a ne sont jamais en contact.

Quoiqu'elle comporte de nombreux avantages, la technique de radioactivité de surface présente un inconvénient majeur: celui du marquage.

Nous avons rapporté que suite au marquage, les aires moléculaires mesurées pour le [^{14}C] cytochrome c sont légèrement supérieures à celles de la protéine native. De plus, la pression où l'éjection du cytochrome c d'une monocouche de PC(18:1) est décrie de deux mN m^{-1} lorsque la protéine est marquée. Cet effet du marquage pose le problème de la modification des propriétés de la protéine suite à une réaction chimique qui n'est pas douce. Nous demeurons absolument convaincus de la grande utilité de la mesure de radioactivité de surface dans la caractérisation des interactions chlorophylle-protéine et lipide-protéine à l'interface air-eau. Le seul moyen de contourner les désavantages propres au marquage de la protéine consiste à se tourner vers la biosynthèse des protéines à l'aide de précurseurs radioactifs. Cette procédure est non-perturbante mais elle est cependant très exigeante puisqu'elle demande de pouvoir contrôler la biosynthèse d'une protéine donnée et d'en effectuer par la suite l'extraction et la purification. De la même façon, il est possible d'obtenir de la [^{14}C] chlorophylle a biosynthétiquement marquée en utilisant l'acide aminolévulinique (Bhyada et Castelfranco (1985)).

La vérification de l'applicabilité de la méthode de caractérisation des interactions lipide-protéine à d'autres systèmes présentant une incorporation réversible régularisée par la pression de surface constitue une poursuite très intéressante de ce travail. Nous avons cependant dû avouer notre impuissance à identifier spécifiquement la nature des interactions impliquées. Toutefois, il s'avère raisonnable de conclure que l'interaction chl a-cyt c se joue au niveau de l'anneau porphyrine du chromophore. En effet, la chl a présente deux portions: le cycle porphyrine et la chaîne phytyle. Si l'interaction entre la

chlorophylle a et le cytochrome c était purement une interaction hydrophobe, un comportement identique à celui observé pour le système PC-cyt c serait noté car la chaîne phytyle de la chl a présente des propriétés analogues des chaînes hydrocarbonées de la PC. Afin d'obtenir plus d'éléments relatifs à la spécificité de ces interactions lipide-protéine, nous croyons qu'il est nécessaire de se tourner vers des outils spectroscopiques plus puissants telle la spectroscopie infra-rouge. Cette technique appliquée à l'étude des monocouches à l'interface air-eau permettrait de sonder spécifiquement la structure secondaire de la protéine et le couplage entre des fonctions chimiques particulières. Les difficultés majeures relatives à l'application de cette technique au système présenté est d'une part la complexité des spectres des protéines et d'autre part la faible absorptivité d'une monocouche. Nous croyons que le jeu en vaut la chandelle puisqu'un tel outil, combiné à la technique d'étude des systèmes lipide-protéine rapportée dans ce travail, permettrait de faire progresser de façon phénoménale l'étude de ces systèmes binaires, modèles des biomembranes.

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, B.M., Ketterson, J.B., Miyano, K. et Kueny, A. Shear rigidity of spread stearic acid monolayers on water, J. Chem. Phys., 1981, 75, 3137-3141.
- Adamson, A.W. Physical Chemistry of Surfaces. (2nd ed.) New York: Interscience Publishers, 1967.
- Aghion, J., Broyde, S.B. et Brody, S.S. Surface reactions of chlorophyll a in monolayers at a water-air interface. Photochemistry and complex formation. Biochem., 1969, 8, 3120-3126.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. et Watson, J.D. Molecular Biology of the cell. New York:Garland Publishing Inc., 1983.
- Anderson, J.M., Waldron, J.C. et Thorne, S.W. Chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoids. Spectral characterization of six complexes resolved by an improved electrophoretic procedure. FEBS Letters, 1978, 92, 227-233.
- Baret, J.F., Hasmona, H., Firpo, J.L., Dupin, J.J. et Dupeyrat, M. The different types of isotherm exhibited by insoluble fatty acid monolayers. A theoretical interpretation of phase transitions in the condensed state. Chem. Phys. Lipids, 1982, 30, 177-187.

- Barque, J.P. et Dervichian, D.G. Enzyme-substrate interaction in lipid monolayers. II. Binding and activity of lipase in relation to enzyme and substrate concentration and to other factors. J. Lipid. Res., 1979, 20, 447-455.
- Bellamy, W.D., Gaines, G.L. et Tweet, A.G. Preparation and properties of monomolecular films of chlorophyll a and pheophytin a , J. Chem. Phys., 1963, 39, 2528-2537.
- Bellemare, F. Communication personnelle, UQTR, 1986.
- Bergman, C., Gandvik, E-K., Nyman, P.O. et Strid, L. The amino acid sequence of stellacyanin from the lacquer tree. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1977, 77, 1052-1059.
- Betts, J.J. et Pethica, B.A. The ionization characteristics of monolayers of weak acids and bases, Trans. Faraday Soc., 1956, 52, 1581-1589.
- Bhyada, D. et Castelfranco, P.A. Chlorophyll biosynthesis and assembly into chlorophyll-protein complexes in isolated developing chloroplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 5370-5374.
- Bishop, D.G., Kendrick, J.R., Bayston, J.H., MacPherson, A.S. et Johns, S.R. Monolayer properties of chloroplast lipids. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 602, 248-259.
- Blodgett, K.B. Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface, J. Am. Chem. Soc., 1935, 57, 1007-1022.

- Bougis, P., Rochat, H., Piéroni, G. et Verger, R. Penetration of phospholipid monolayers by cardiotoxins. Biochem., 1981, 20, 4915-4920.
- Bougis, P.E., Teissié, J., Rochat, H., Piéroni, G. et Verger, R. Mixed phospholipid-cardiotoxin monomolecular films studied by intrinsic polarized surface fluorescence. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1987, 143, 506-511.
- Boxer, S.G. et Wright, K.A. Preparation and properties of a chlorophyllide-apomyoglobin complex, J. Am. Chem. Soc., 1979, 101, 6791-6794.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 1976, 72, 248-254.
- Brasseur, R., De Meutter, J. et Ruyschaert, J-M. Mode of insertion of chlorophyll a in a lipid layer. A conformational approach. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 764, 295-300.
- Brecht, E. The light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex II of higher plants: results from a twenty-year research period. Photochem. Photobiol., 1986, 12, 37-50.
- Brody, S.S. Surface properties of plastocyanin at an air-water interface. Z. Naturforsch., 1973, 28c, 397-400.
- Brody, S.S. Surface properties of monomolecular films of reduced plastocyanin at a nitrogen-water interface. Z. Naturforsch., 1975, 30c, 318-322.

- Brown, J.S. Four universal forms of chlorophyll *a*. Plant Physiol., 1972, 49, 421-429.
- Brown, J.S. Fluorescence spectroscopy of a P700-chlorophyll-protein complex. Photochem. Photobiol., 1977, 26, 519-525.
- Brown, J.S. Absorption and fluorescence spectra of chlorophyll-proteins isolated from *Euglena gracilis*. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 591, 9-21.
- Brown, J.S. A new evaluation of chlorophyll absorption in photosynthetic membranes. Photosynthesis Res., 1983, 4, 375-383.
- Brown, J.S. et Schoch, S. Spectral analysis of chlorophyll-protein complexes from higher plant chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta, 1981, 636, 201-209.
- Bull, H.B. Spread monolayers of protein. Adv. Prot. Chem., 1947, 3, 95-121.
- Burkey, K.O. et Gross, E.L. Use of chemical modification to study the relationship between activity and net protein charge of the photosystem I core complex. Biochem., 1981, 20, 2961-2967.
- Cadenhead, D.A. Monomolecular films as biomembrane models. In G. Benga (Ed.) Structure and Properties of Cell Membranes (V. III). Boca Raton (MD): CRC Press, 1985, pp 21-62.
- Chapados, C. et Leblanc, R.M. Aggregation of chlorophylls in monolayers. V. The effect of water on chlorophyll *a* and chlorophyll *b* in mono- and multilayers arrays. Biophys. Chem., 1983, 17, 211-244.

- Cheesman, D.F. et Davies, J.T. Physicochemical and biological aspects of protein at interfaces. Adv. Prot. Chem., 1954, 9, 439-501.
- Chemical Rubber Company, CRC Handbook of Chemistry and Physics (63rd ed.), Boca Raton, FL: CRC Press, Inc., 1982-83, F-34.
- Chin, P. et Brody, S.S. Surface properties of monomolecular films of oxidized and reduced cytochrome c and f. Biochem., 1975, 14, 1190-1193.
- Chin, P. et Brody, S.S. Mixed monomolecular films of chlorophyll and cytochromes. Z. Naturforsch., 1976, 31c, 44-47.
- Chothia, C. Hydrophobic bonding and accessible surface area in proteins. Nature, 1974, 248, 338-339.
- Chou, P.Y. et Fasman, G.D. Empirical predictions of protein conformation. Annu. Rev. Biochem., 1978, 47, 251-276.
- Colman, P.M., Freeman, H.C., Guss, J.M., Murata, M., Norris, V.A., Ramshaw, J.A.M. et Venkatappa, M.P. X-ray cristal structure analysis of plastocyanin at 2.7 Å resolution. Nature, 1978, 272, 319-324.
- Cook, H.D. et Ries, H.E.Jr. Effects of the spreading solvent on monolayers as determined by pressure-area and radioactivity-area isotherms. J. Phys. Chem., 1956, 60, 1533-1536.
- Cornell, D.G. et Carroll, R.J. Electron microscopy of lipid-protein monolayers. Colloids Surfaces, 1983, 6, 385-393.

- Cornell, D.G. et Carroll, R.J. Miscibility in lipid-protein monolayers. J. Colloid Interface Sci., 1985, 108, 226-233.
- Cumper, C.W.N. et Alexander, A.E. The surface chemistry of proteins. Faraday Soc. Trans., 1950, 46, 235-243.
- Das, M.L. et Crane, F.L. Proteolipids.I. Formation of phospholipid-cytochrome c complexes. Biochem., 1964, 3, 696-700.
- Davies, R.J., Goodwin, G.C., Lyle, I.G. et Jones, M.N. The behavior of glycophorin at the air-water interface. Colloids Surfaces, 1983, 8, 29-43.
- Davies, R.J., Goodwin, G.C., Lyle, I.G. et Jones, M.N. The interaction of glycophorin with dipalmitoylphosphatidylcholine at the air-water interface. Colloids Surfaces, 1984, 8, 261-270.
- Davis, R.C. et Pearlstein, R.M. Chlorophyllin-apomyoglobin complexes. Nature, 1979, 280, 413-415.
- Davis, R.C., Knotts, R.R., Seely, G.R. et Shaw, E.R. A non-fluorescent complex of chlorophyll a with plastocyanin. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1985, 126, 610-614.
- Dawson, R.M.C. Enzymatic hydrolysis of monomolecular layers of lipids. Methods Enzymol., 1969, 15, 633-648.
- Dayhoff, M.O. Atlas of protein sequence and structure. Silver Spring (MD):Natl Biomed. Res. Found., 1972.

- De Costa, S.M.de B., Froines, J.R., Harris, J.M., Leblanc, R.M., Orger, B.H. et Porter, G. Model for photosynthesis. III. Primary processes of chloroplast pigments in monomolecular arrays on solid surfaces. Proc. Roy. Soc. Lond., 1972, 326 A, 503-519.
- De Feijter, J.A., Benjamins, J. et Veer, F.A. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interface. Biopolymers, 1978, 17, 1759-1772.
- Demel, R.A. Lipid-protein interactions in monomolecular films. Dans A. Martonosi (Ed.), Membrane and transport (Vol. 1). New York: Plenum Press, 1982, pp. 159-164.
- Demel, R.A., London, Y., Geurts Van Kessel, W.S.M., Vossenberg, F.G.A. et Van Deenen, L.L.M. The specific interaction of myelin basic protein with lipids at the air-water interface. Biochim. Biophys. Acta, 1973, 311, 507-519.
- Den Engelsen D. Ellipsometry of anisotropic films. J. Opt. Soc. Am., 1971, 61, 1460-1466.
- Den Engelsen, D. Optical anisotropy in ordered systems of lipids. Surf. Sci., 1976, 56, 272-280.
- Den Engelsen, D. et De Koning, B. Ellipsometric study of organic monolayers. Part 1.-Condensed monolayers. J. Chem. Soc. Faraday I, 1974, 70, 1603-1613.

- Dervichian, D.G. A comparative analysis of phase transitions in hydrotropic liquid crystals and in monolayers of long-chain substances. J. Colloid Interface Sci., 1982, 90, 71-85.
- Dervichian, D.G. et Barque, J.P. Enzyme-substrate interaction in lipid monolayers. I. Experimental conditions and fundamental kinetics. J. Lipid Res., 1979, 20, 437-446.
- Désormeaux, A. et Leblanc, R.M. Electronic and photoacoustic spectroscopies of chlorophyll a in monolayer and multilayer arrays. Thin Solid Films, 1985, 132, 83-90.
- Dickerson, R. E. The structure and history of an ancient protein. Sci. Amer., 1972, 226, 58-72.
- Ducharme, D. Construction, mise au point d'un ellipsomètre et étude ellipsométriques de phospholipides à l'interface air-eau. Thèse de doctorat, Université Laval, 1987.
- Ducharme, D., Salesse, C. et Leblanc, R.M., Ellipsometric studies of rod outer segment phospholipids at the nitrogen-water interface. Thin Solid Films, 1985, 132, 83-90.
- Eisenberg, D. Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. Annu. Rev. Biochem., 1984, 53, 595-623.
- Eisenberg, D., Schwartz, E., Komaromy, M. et Wall, R. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. J. Mol. Biol., 1984a, 179, 125-142.

- Eisenberg, D., Weiss, R.M. et Terwilliger, T.C. The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984b, 81, 140-144.
- Fereshtekhou, S., Neuman, R.D. et Ovalle, R. Electron microscopic studies of monolayers at the air-water interface. J. Colloid Interface Sci., 1986, 109, 385-397.
- Fischer, A. et Sackmann, E. Electron microscopy and electron diffraction study of coexisting phases of pure and mixed monolayers transferred onto solid substrates. J. Colloid Interface Sci., 1986, 112, 1-14.
- Fukuzawa, K., Ikeno, H., Tokomura, A. et Tsukatani, H. Effect of α -tocopherol incorporation on glucose permeability and phase transition of lecithin liposomes. Chem. Phys. Lipids, 1979, 23, 13-22.
- Fulford, A.J.C. et Peel, W.E. Lateral pressures in biomembranes estimated from the dynamics of fluorescence probes. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 598, 237-246.
- Gaines, G.L. Jr. Some observations on monolayers of 14-carbon labelled stearic acid. J. Colloid Sci., 1960, 15, 321-339.
- Gaines, G.L. Jr. Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces. New York: Interscience Publishers, 1966.
- Gaines, G.L. Jr. On the history of Langmuir-Blodgett films. Thin Solid Films, 1983, 99, ix-xiii.

- Gorter, E. et Grendel, F. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. J. Exptl. Med., 1925, 41, 439-443.
- Graham, D.E. Protein adsorption and penetration of monomolecular layers in the absence and presence of cadmium. Thalassia Jugosl., 1980, 16, 268-274.
- Graham, D.E. et Phillips, M.C. Proteins at liquid interfaces. II. Adsorption isotherms. J. Colloid Interface Sci., 1979a, 70, 415-426.
- Graham, D.E. et Phillips, M.C., Proteins at liquid interfaces. III. Molecular structures of adsorbed films. J. Colloid Interface Sci., 1979b, 70, 427-439.
- Gruen, D. W. R. et Wolfe, J. Lateral tensions and pressures in membranes and lipid monolayers. Biochim. Biophys. Acta, 1982, 688, 572-580.
- Guay, D. Etude thermodynamique des systèmes monomoléculaires mixtes chl a/ α -TQ, chl a/PQ 2, chl a/PQ 3 et chl a/PQ 9 à l'interface air-eau. Mémoire de maîtrise, UQTR, 1986.
- Guay, D. et Leblanc, R.M. Excess free energies of interaction of chlorophyll a with α -tocopherylquinone and plastoquinone 3 and 9. A mixed monolayer study. Langmuir, 1987, 3, 575-580.
- Guy, H.R. Amino acid side-chain partition energies and distribution of residues in soluble proteins. Biophys. J., 1985, 47, 61-70.
- Haehnel, W., Präpper, A. et Krause, H. Evidence for complexed plastocyanin as the immediate electron donor of P-700. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 593, 384-399.

- Harkin, W.D. et Fischer, E.K. Contact potentials and the effects of unimolecular films on surface potentials. I. Films of acid and alcohols. J. Chem. Phys., 1933, 1, 852-862.
- Heithier, H., Ballschmiter, K. et Möhwald, H. Liquid-crystalline phase transition of monomolecular layers of chlorophyll a. Photochem. Photobiol., 1983, 37, 201-205.
- Herrington, T.M. et Sahi, S.S. Desorption of bovine serum albumin from the air-water interface. Food Emulsions Foams, 1987, 58, 188-206.
- Hifeda, Y.M. et Rayfield, G.W. Phase transitions in fatty acid monolayers containing a single double bond in the fatty acid tail, J. Colloid Interface Sci., 1985, 104, 209-215.
- Hirsch, R.E. et Brody, S.S. Spectral properties of chlorophyll a monolayers: Monolayers of chlorophyll a and pheophytin at a gas-water interface. Photochem. Photobiol., 1979, 29, 589-596.
- Hirsch, R.E. et Brody, S.S. Absorption spectra of mixed monomolecular films of chlorophyll and photosynthetic electron carriers at a gas-water interface. Arch. Biochem. Biophys., 1980, 199, 506-514.
- Iriyama, K. et Yoshiura, M. Separation of chlorophyll a and chlorophyll b by column chromatography. J. Chromatogr., 1979, 177, 154-156.
- Israelachvili, J. The packing of lipids and proteins in membranes. Dans D.W. Deamer (Ed.), Light Transducing Membranes. New York: Academic Press, 1978, pp. 91-107.

- Ivanova, M., Panaiotov, I., Trifonova, T., Echkenazi, M., Konstantinov, G. et Ivanova, R. Interaction of antilipid A immunoglobulin G and normal immunoglobulin G, incorporated in a lipid A monolayer. Colloids Surfaces, 1984, 10, 269-282.
- Ivanova, M., Panaiotov, I., Eshkenazy, M., Tekelieva, R. et Ivanova, R. Interaction of lipid A with antilipid A immunoglobulin G and normal immunoglobulin G in mixed monolayers. Colloids Surfaces, 1986, 17, 159-167.
- Ivanovskaya, N.I., Nekrasov, L., Chasovnikova, L.V. et Kobozev, N.I. Spectral properties of chlorophyll monolayers resting on a protein monolayer at a water-air interface. Rus. J. Phys. Chem., 1972, 46, 970-972.
- Janin, J. Surface and inside volumes in globular proteins. Nature, 1979, 277, 491-492.
- Jähnig, F. Thermodynamics and kinetics of protein incorporation into membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 3691-3695.
- Jentoft, N. et Dearborn, D.G. Labeling of protein by reductive methylation using sodium cyanoborohydride, J. Biol. Chem., 1979, 254, 4359-4365.
- Jönsson, U., Malmqvist, M. et Rönnerberg, I. Adsorption of immunoglobulin G, protein A, and fibronectin in the submonolayer region evaluated by a combined study of ellipsometry and radiotracer techniques. J. Colloid Interface Sci., 1985, 103, 360-372.

- Katz, J.J. et Norris, J.R.Jr. Chlorophyll and light energy. Curr. Top. Bioenerg., 1973, 5, 41-75.
- Katz, J.J., Shipman, L.L., Cotton, T.M. et Janson, T.R. Chlorophyll aggregation: Coordination interactions in chlorophyll monomers, dimers, and oligomers. Dans, The porphyrins (Vol. 5). New York: Academic Press, 1978, pp. 401-458.
- Kennedy, S.J. Structures of membrane proteins. J. Membr. Biol., 1978, 42, 265-279.
- Khristin, M.S., Interaction of immobilized plastocyanin with cytochrome f and the reaction center of photosystem I in a reconstituted system., Biokhimiya, 1983, 48, 905-976.
- Krause, G.H. et Weis, E. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. Photosynthesis Res., 1984, 5, 139-157.
- Krebs, K.E. et Phillips, M.C. The helical hydrophobic moment and surface activities of serum apolipoproteins. Biochim. Biophys. Acta, 1983, 754, 227-230.
- Krebs, K.E. et Phillips, M.C. The contribution of α -helices to the surface activities of proteins. FEBS Letters, 1984, 175, 263-266.
- Ksenzhek, O.S., Gevod, V.S. et Koganov, M.M. Surface potential of cytochrome-phospholipid monolayers at an electrolyte-air interface. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 1975, 5, 1211-1214.

- Kyle, D.J., Baker, N.R. et Arntzen, C.J. Spectral characterization of photosystem I fluorescence at room temperature using thylakoid protein phosphorylation. Photobiochem. Photobiophys., 1983, 5, 79-85.
- MacCrackin, F.L., A fortran program for analysis of ellipsometer measurements. National Bureau of Standards Technical Note 479. Washington, D.C., 1969.
- MacRitchie, F. Desorption of protein monolayers. J. Colloid Interface Sci., 1977, 61, 223-226.
- MacRitchie, F. Equilibria between adsorbed and displaced segments of protein monolayers. J. Colloid Interface Sci., 1981, 79, 461-464.
- MacRitchie, F., Desorption of proteins from the air/water interface, J. Colloid Interface Sci., 1985, 105, 119-123.
- MacRitchie, F. et Ter-Minassian-Saraga, L. Stability of highly compressed spread monolayers of ¹²⁵I-labelled and cold BSA. Progr. Colloid Polym. Sci., 1983, 68, 14-19.
- MacRitchie, F et Ter-Minassian-Saraga, L. Concentrated protein monolayers: Desorption studies with radiolabelled bovine serum albumin. Colloids Surfaces, 1984, 10, 53-64.
- Markwell, J.P., Thornber, J.P. et Boggs, R.T. Higher plant chloroplasts: Evidence that all the chlorophyll exists as chlorophyll-protein complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 1233-1235.

- Middleton, S.R. et Pethica, B.A. Electric field effects on monolayer at the air-water interface. Faraday Symp. Chem. Soc., 1981, 16, 109-123.
- Moore, B., Knobler, C.M., Broseta, D. et Rondelez, F. Studies of phase transitions in Langmuir monolayers by fluorescence microscopy. J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2, 1986, 82, 1753-1761.
- Morse II, P.D. et Deamer, D.W. Interaction of cytochrome c with lipid monolayers. Biochim. Biophys. Acta, 1973, 298, 769-782.
- Nagarajan, R. et Ruckenstein, E. Critical micelle concentration: A transition point for micellar size distribution. A statistical thermodynamical approach., J. Colloid Interface Sci., 1977, 60, 221-231.
- Nagle, J.F. Theory of lipid monolayer and lipid bilayer chain-melting phase transition. Faraday Discuss. Chem. Soc., 1986, 81, 151-162.
- Neame, K.D. et Homewood, C.A. Liquid scintillation counting. New York: John Wiley & Sons, 1974.
- Neurath, H. et Bull, H.B. The surface activity of proteins. Chem. Rev., 1938, 23, 391-435.
- Omata, T. et Murata, N. A rapid and efficient method to prepare chlorophyll a and b from leaves. Photochem. Photobiol., 1980, 31, 183-185.
- Pallas, N.R. et Pethica, B.A. The surface tension of water, Colloids Surfaces, 1983, 6, 221-227.

- Pattus, F., Martinez, M.C., Dargent, B., Cavard, D., Verger, R. et Lazdunski, C.
Interaction of colicin A with phospholipid monolayers and liposomes.
Biochem., 1983, 22, 5698-5703.
- Perkins, H.J. et Roberts, D.W.A. Purification of chlorophylls, pheophytins and
pheophorbides for specific activity determinations. Biochim. Biophys. Acta,
1962, 58, 486-498.
- Phillips, M.C., Landbrooke, B.D. et Chapman, D. Molecular interactions in mixed
lecithin systems. Biochim. Biophys. Acta, 1970, 196, 35-44.
- Phillips, M.C. et Krebs, K.E. Studies of apolipoproteins at the air-water interface.
Methods Enzymol., 1986, 128, 387-403.
- Picard, G., Thèse de doctorat, UQTR, 1988.
- Picard, G., Munger, G., Leblanc, R.M., Lesage, R., Sharma, D., Siemiarczuk, A. et
Bolton, J.R. Fluorescence lifetime of chlorophyll a in pure and mixed
Langmuir-Blodgett films, Chem. Phys. Lett., 1986, 129, 41-47.
- Quinn, P.J. et Dawson, R.M.C. The interaction of cytochrome c with monolayers
of phosphatidylethanolamine. Biochem. J., 1969a, 113, 791-803.
- Quinn, P.J. et Dawson, R.M.C., Interactions of cytochrome c and
[¹⁴C]carboxymethylated cytochrome c with monolayers of
phosphatidylcholine, phosphatidic acid and cardiolipin. Biochem. J., 1969b,
115, 65-75.

- Quinn, P.J. et Dawson, R.M.C. An analysis of the interaction of protein with lipid monolayers at the air/water interface. Biochem. J., 1970, 116, 671-680.
- Reynolds, J.A., Gilbert, D.B. et Tanford, C. Empirical correlation between hydrophobic free energy and aqueous cavity surface area. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 2925-2927.
- Richards, F.M. Areas, volumes, packing, and protein structure. Annu. Rev. Biophys. Bioeng., 1977, 6, 151-176.
- Ries, H.E.Jr. Stable ridges in a collapsing monolayer. Nature, 1979, 281, 287-289.
- Ries, H.E.Jr. et Kimball, W.A. Electron micrographs of monolayers of stearic acid. Nature, 1958, 181, 901.
- Rietveld, A., Ponjee, G.A.E., Schiffers, P., Jordi, W., van de Coolwijk, P.J.F.M., Demel, R.A., Marsh, D. et de Kruijff, B. Investigations on the insertion of the mitochondrial precursor protein apocytochrome c into model membranes. Biochim. Biophys. Acta, 1985, 818, 398-409.
- Robertson, R.N. The lively membranes. Cambridge: Cambridge University Press, 1983, 38.
- Rose, G.D., Geselowitz, A.R., Lesser, G.J., Lee, R.H. et Zehfus, M.H. Hydrophobicity of amino acid residues in globular proteins. Science, 1985, 229, 834-838.
- Salesse, C. Thèse de doctorat, UQTR, 1987.

- Salesse, C., Boucher, F. et Leblanc, R.M. Propriétés interfaciales des phospholipides de la membrane des bâtonnets réiniens, Rev. Can. Biol. Exptl., 1983, 42, 123-130.
- Scawen, M.D., Ramshaw, J.A.M. et Boulter, D. The amino acid sequence of plastocyanin from spinach (*Spinacia oleracea* L.). Biochem. J., 1975, 147, 343-349.
- Seely, G.R. et Jensen, R.G. Effect of solvent on the spectrum of chlorophyll, Spectrochim. Acta, 1965, 21, 1835-1845.
- Shibata, H., Ochiai, H., Kawashima, T., Okamoto, T. et Inamura, I. Preparation and properties of the water-soluble chlorophyll-bovine serum albumine complexes. Biochim. Biophys. Acta, 1986, 852, 175-182.
- Shiraki, M., Yoshiura, M. et Iriyama, K. Rapid and easy separation of chlorophylls, their derivatives, and yellow pigments by thin-layer chromatography. Chem. Lett., 1978, 1, 103-104.
- Singer, S.J. et Nicolson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science, 1972, 175, 720-731.
- Singleton, V.S., Gray, M.S., Brown, M.L. et White, J.L. Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids. J. Am. Oil Chem. Soc., 1965, 42, 53-56.
- Small, D.M. Lateral chain packing in lipids and membranes. J. Lipid Res., 1984, 25, 1490-1500.

- Small, D.M. General properties of lipid conferred by the aliphatic chain. Dans D.M. Small, The Physical Chemistry of Lipids from Alkanes to Phospholipids, The Handbook of Lipid Research Series, Vol.3. D.Hanahan (ed.). New York: Plenum Press, 1986, pp 21-41.
- Stryer, L. Biochemistry (2nd ed.). San Francisco: W.H. Freeman and Co., 1981.
- Suits, C.G. et Way, H.E. (eds.). The collected works of Irving Langmuir, volumes 7, 8 et 9. New York: Pergamon Press, 1961.
- Suponeva, E.P., Kisselev, B.A., Pancoska, P., Varinec, E. et Vacek, K. Chlorophyll a colloidal systems in water environment and their interactions with synthetic polypeptides. Photobiochem. Photobiophys., 1984, 8, 315-322.
- Szalay, L., Tombácz, Várkonyi, Z. et Faludi-Dániel, A. Detergent effects on an albumin-chlorophyll complex model of photosynthetic protein-pigment complexes. Acta Phys. Acad. Sci. Hung., 1982, 53, 225-235.
- Takabe, T., Ishikawa, H., Niwa, S. et Itoh, S. Electron transfer between plastocyanin and P700 in highly-purified photosystem I reaction center complex. Effects of pH, cations, and subunit peptide composition. J. Biochem., 1983, 94, 1901-1911.
- Tancrede, P., Parent, L., Paquin, P. et Leblanc, R.M. Interactions in mixed monolayers between Dioleoyl-L-phosphatidylcholine and all-trans retinal. J. Colloid Interface Sci., 1981, 83, 606-613.

- Tancrède, P., Munger, G. et Leblanc, R.M. Excess free energies of interaction of chlorophyll a with monogalactosyldiacylglycerol and phytol. A mixed monolayer study. Biochim. Biophys. Acta, 1982, 689, 45-54.
- Taneva, S. Panaiotov, I. et Ter-Minassian-Saraga, L. Effect of surface pressure on mixed dipalmitoyllecithin-serum albumin monolayer composition. Colloids Surfaces, 1984, 10, 101-111.
- Teissié, J. Interaction of cytochrome c with phospholipid monolayers. Penetration of protein as functions of the packing density of film, nature of the phospholipids, and the ionic content of the aqueous phase., Biochem., 1981, 20, 1554-1560.
- Teissié, J. et Baudras, A. A fluorescence study of the binding of cytochrome c to mixed-phospholipid microvesicles: evidence for a preferred orientation of the bound protein. Biochimie, 1977, 59, 693-703.
- Ter-Minassian-Saraga, L. Protein denaturation on adsorption and water activity at interfaces: An analysis and suggestion. J. Colloid Interface Sci., 1981, 80, 393-400.
- Trurnit, H.J. A theory and method for the spreading of protein monolayers. J. Colloid Sci., 1960, 15, 1-13.
- Urbaneja, M.A., Fidelio, G.D., Lucy, J.A. et Chapman, D. The interaction of an anti-lipid antibody (TEPC 15) with a model biomembranes system (monolayer). Biochim. Biophys. Acta, 1987, 898, 253-256.

- Van Buren, J.P., Extraction of chlorophylls a and b from different binding sites on thylakoid chlorophyll-protein. J. Agric. Food Chem., 1985, 33, 204-208.
- Watanabe, N., Shirakawa, T., Iwahashi, M., Ohbu, K. et Seimiya, T. Effect of surface charge on adsorption of bovine serum albumin as studied by ellipsometry. I. Adsorption on cationic monolayer. Colloid Polym. Sci., 1986, 264, 903-908.
- Wilkinson, M.C., Zaba, B.N., Taylor, D.M., Laidman, D.L. et Lewis, T.J. A monolayer study on cytochrome b₅-phospholipid interactions. Biochim. Biophys. Acta, 1986, 857, 189-197.
- Willey, D.L., Auffret, A.D. et Gray, J.C. Structure and topology of cytochrome f in pea chloroplast membranes. Cell, 1984, 36, 555-562.

ANNEXE A

LES PROPRIETES INTERFACIALES DE L'ACIDE OCTADECANOIQUE

Les systèmes lipide-protéine et chlorophylle-protéine sont beaucoup plus complexes que les systèmes binaires constitués de deux composés insolubles dans la sous-phase. Cette complexité tient en grande partie du fait que la protéine peut se répartir entre la sous-phase et le film insoluble. Naturellement, la compréhension des interactions qui prennent place dans le système mixte doit passer par une bonne connaissance des propriétés interfaciales des composés purs. De plus, il est nécessaire de bien connaître les limites des mesures expérimentales choisies. Pour cette raison, nous avons caractérisé les isothermes Π - σ , Γ - σ et $-\delta\Delta$ - σ de l'acide octadécanoïque étalé à l'interface air-eau. En plus de fournir une base intéressante d'interprétation des isothermes ellipsométriques, ces expériences nous ont permis de calibrer le détecteur de radioactivité et d'en identifier les limites d'opération.

A.1 L'isotherme de pression de surface-aire moléculaire de l'acide octadécanoïque

L'isotherme Π - σ de l'acide octadécanoïque étalé sur une sous-phase de tampon phosphate 10^{-3} M, pH=7,0 est présentée à la Figure 71 . Cette isotherme comporte une compression jusqu'à 20 mN m^{-1} , une expansion à pression nulle et une recompression jusqu'à forte pression. L'écart maximal par rapport à l'isotherme moyenne est $\pm 0,7 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$ entre 0 et 25 mN m^{-1} . Pour des

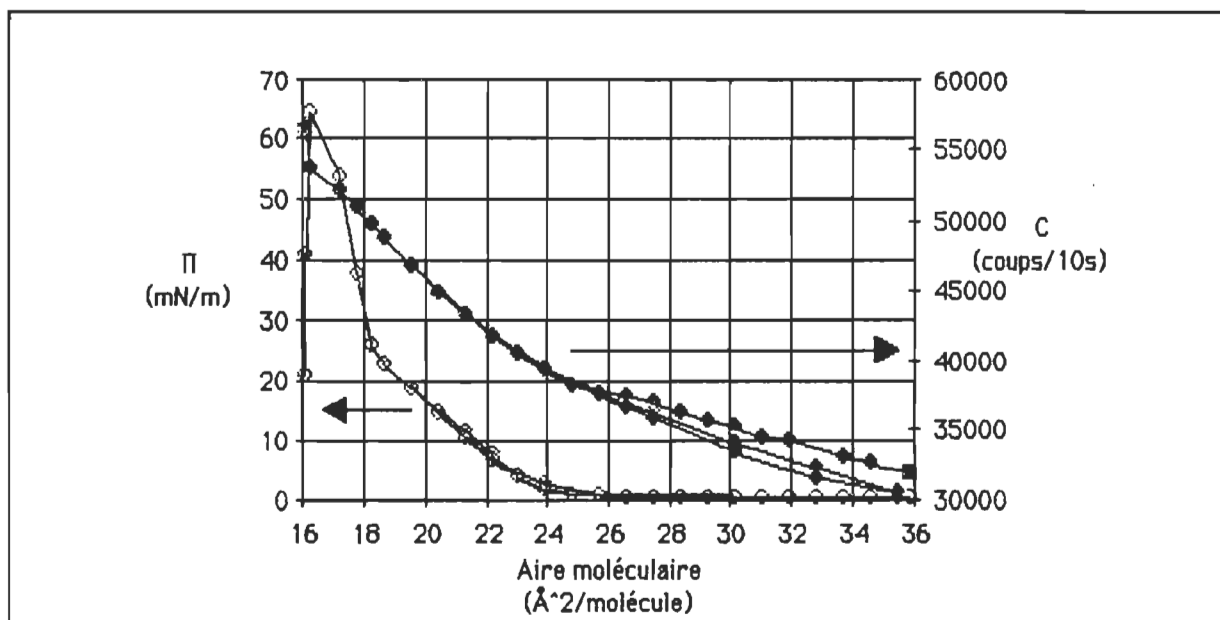


Figure 71. Isothermes Π - σ et Γ - σ de l'acide octadécanoïque étalé à l'interface air-Tampon phosphate 10^{-3}M , pH-7,0. Le film fut soumis à un cycle compression-expansion-compression. Conditions expérimentales: Surface de fenêtre de $25,5\text{ cm}^2$, tension d'opération-1700V, discriminateur-0,5V, débit de P-5 de $71,9\text{ mL min}^{-1}$ et distance détecteur-interface = 0,610 cm. Rendement global de détection: 12%.

pressions supérieures à 25 mN m^{-1} , les isothermes obtenues diffèrent grandement d'une expérience à l'autre. Comme nous le verrons plus loin, ces différences sont la conséquence de modifications importantes de la structure du film. Pour fin de comparaison, nous avons groupé au Tableau 10 les valeurs d'aires moléculaires présentées sur notre isotherme Π - σ et des valeurs rapportées dans la littérature. Compte tenu des erreurs expérimentales, nos mesures se comparent avantageusement aux valeurs rapportées dans la littérature. La seule isotherme qui présente des différences significatives est celle rapportée par Cook et Ries (1956). Dans le même article, les auteurs rapportent des isothermes Π - σ identiques à celle que nous présentons; ces isothermes furent obtenues alors que le chloroforme et l'hexane furent substitués au benzène comme solvant d'étalement. Ce résultat, combiné à la

constatation que les différences présentes entre notre courbe et celle rapportée par ces auteurs s'amenuisent alors que la pression de surface augmente, laisse présager que le benzène utilisé dans l'étude de Cook et Ries était contaminé par des impuretés tensioactives. L'isotherme Π - σ de l'acide octadécanoïque comporte trois zones présentant des compressibilités différentes: $\Pi=0$, $0 \leq \Pi \text{ (mN m}^{-1}\text{)} \leq 25$ et $\Pi > 25$.

Tableau 10

Comparaison des aires moléculaires mesurées à diverses pressions de surface pour l'acide octadécanoïque étalé à l'interface air-eau. Les isothermes de référence furent toutes effectuées à un pH voisin de 7,0 et en absence de sel.

Π (mN m ⁻¹)	σ (Å ² molécule ⁻¹)			
référence	(1)	(2)	(3)	(ce travail)
0	38,0	25,2	25,0	25,2
5	28,6	22,9	23,0	23,4
10	23,5	22,0	22,0	21,9
15	22,1	21,0	21,5	20,8
20	20,1	-	20,0	19,7
25	20,0	-	19,1	18,5

(1)Cook et Ries (1956)

(2)Abraham et coll. (1982)

(3)Hifeda et Rayfield (1985)

La première zone est généralement associée à l'état gazeux du film. Nous avons certaines restrictions concernant l'utilisation du terme "gazeux" afin de qualifier cet état. Le volume moyen occupé par les molécules d'un gaz est, à pression atmosphérique, de quelques ordres de grandeur supérieur au volume moléculaire. Pour la plupart des gaz considérés dans des conditions standards,

la portion du volume occupée par les atomes est d'environ 0,15 %. Dans notre cas, les aires moléculaires où la pression de surface est nulle ne sont moindres que d'une dizaine d' \AA^2 molécule⁻¹ du point où l'on retrouve les molécules empaquées aussi efficacement que dans un cristal tridimensionnel. A notre avis, l'état gazeux d'un film d'acide octadécanoïque est rencontré à quelques centaines d' \AA^2 molécule⁻¹. Lorsque nous voudrions référer à cet état du film, nous parlerons du film relâché. Comme nous le verrons ultérieurement, le film comprimé dans cet état est très inhomogène et présente des discontinuités importantes.

La seconde zone comprise entre 0 et 25 mN m⁻¹ correspond à l'état où la compression provoque un redressement des chaînes hydrocarbonées jusqu'à obtenir un cristal bidimensionnel. Il est à noter que lorsque nous parlons de pression nulle, nous signifions que la pression est non-détectable avec notre balance dont la précision est de $\pm 0,3$ mN m⁻¹. Cette zone est caractérisée par le fait qu'en compression et en expansion, les isothermes Π - σ obtenues sont identiques et, lorsque la compression est interrompue, la pression de surface est stable sur des périodes de temps de plus de 30 minutes. L'homogénéité du film présent dans cet état sera démontrée subséquemment.

La troisième zone, généralement associée à une phase solide, présente un comportement fort instable. Lorsque la compression est stoppée au-delà de 25 mN m⁻¹, la pression chute graduellement pour atteindre une valeur d'équilibre apparent voisine du point d'inflexion ($\Pi=25$ mN m⁻¹). Dans le cas des isothermes où la compression est discontinue, $\Pi=25$ mN m⁻¹ représente

également la limite supérieure où la pression de surface est stable lorsque la compression est interrompue. Ainsi, la pression de surface mesurée au-delà de $\Pi=25 \text{ mN m}^{-1}$ n'est pas une valeur d'équilibre. Pour 18 expériences, où la compression fut stoppée à des pressions supérieures à 40 mN m^{-1} , nous avons obtenu une pression de surface d'équilibre apparent de $24,8 \pm 3,0 \text{ mN m}^{-1}$. Pour ces raisons, nous ne sommes pas en accord avec l'idée que le point d'inflexion correspond à une transition d'un état bidimensionnel condensé vers un état bidimensionnel solide (Baret et coll. (1982)). A la lueur des résultats obtenus par ellipsométrie et radioactivité de surface, la chute de pression de surface notée dans cet état correspond à une réorganisation du film bidimensionnel vers un état tridimensionnel. De plus, cette idée est également supportée par le fait que l'aire moléculaire mesurée au maximum de stabilité du film bidimensionnel ($\sigma=18,5 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$) correspond bien aux valeurs rapportées pour la section de chaînes hydrocarbonées analogues dans des cristaux (Dervichian (1982); Small (1984); Small (1986)). Comme l'espace intermoléculaire est pratiquement vide et qu'une réduction supplémentaire de l'espace disponible entraîne une interpénétration des rayons de van der Waals des chaînes grasses voisines, le système n'a d'autre choix que de s'organiser dans une structure tridimensionnelle en répartissant une fraction du film dans la phase aqueuse ou dans l'air.

A.2 Les isothermes de radioactivité de surface-aire moléculaire de l'acide octadécanoïque

Les études portant sur la caractérisation du comportement interfacial de molécules amphiphiles simples par radioactivité de surface ne sont pas nombreuses. Nous citerons parmi les plus importantes celles de Gaines (1960) et de Cook et Ries (1956). La première étude traite principalement du rendement de transfert de films de $[1-^{14}\text{C}]$ acide octadécanoïque et de son interaction avec divers supports alors que la seconde traite de l'influence du solvant d'étalement sur l'organisation du film monomoléculaire d'acide gras. Dans les deux cas, il est mentionné que le film d'acide octadécanoïque est inhomogène à faible pression de surface. Cependant, les auteurs ne déterminent pas la même valeur de Π où le film devient inhomogène; Gaines rapporte une valeur de 10 mN m^{-1} , alors que Cook et Ries parlent d'une pression nulle voisine du point de montée de l'isotherme de pression de surface ($\sigma=34 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$). Ce point de montée réfère à l'aire moléculaire où une pression de surface non-nulle est détectée lors de la compression. En calibrant le détecteur avec le $[^{14}\text{C}]$ acide octadécanoïque pour le dosage du $[^{14}\text{C}]$ cytochrome c, nous avons été confrontés à d'importantes fluctuations de la mesure de radioactivité à une pression de surface nulle. Afin de mieux comprendre l'origine de ces fluctuations, nous avons entrepris l'étude des isothermes Γ - σ de l'acide octadécanoïque pour diverses surfaces actives du détecteur; l'idée sous-jacente à cette stratégie étant de déterminer le point où la surface active de détection s'approche le plus de la dimension des inhomogénéités présentes à l'interface.

A.2.1 Influence de la surface de détection sur les isothermes de radioactivité de surface des films d'acide octadécanoïque. La Fig. 71 présente une superposition des isothermes Π - σ et Γ - σ de l'acide octadécanoïque soumis à un cycle compression-expansion-compression. La surface de détection utilisée pour cette mesure est de 25,5 cm². Pour chaque état de compression compris entre 0 et 20 mN m⁻¹, neuf mesures de radioactivité ont été prises. Les isothermes présentées sont la moyenne de trois expériences. L'isotherme de pression de surface obtenue présente toutes les caractéristiques mécaniques abordées précédemment. Quant à l'isotherme de radioactivité, nous pouvons constater que le comportement lors des phases de compression et d'expansion est le même pour des aires moléculaires inférieures à 26 Å² molécule⁻¹. Pour des aires moléculaires supérieures à 26 Å² molécule⁻¹, il y a des différences entre les valeurs de radioactivité mesurées lors de la compression et de l'expansion. Ces différences sont mieux illustrées dans la Fig. 72, où l'écart maximal mesuré par rapport à la valeur moyenne est exprimé, sous forme relative, pour divers états de compression du film. Entre 18 et 27 Å² molécule⁻¹, la fluctuation maximale du signal par rapport à la valeur moyenne oscille autour de 1%. Au-delà de 28 Å² molécule⁻¹, les fluctuations augmentent légèrement jusqu'à 2,5%. Certes, ces effets sont discrets mais nous allons montrer que la surface de détection influence ce résultat.

La même expérience fut faite en utilisant une surface active de détection de 1 cm². Les isothermes Π - σ et Γ - σ sont présentées à la Fig.73 et la fluctuation

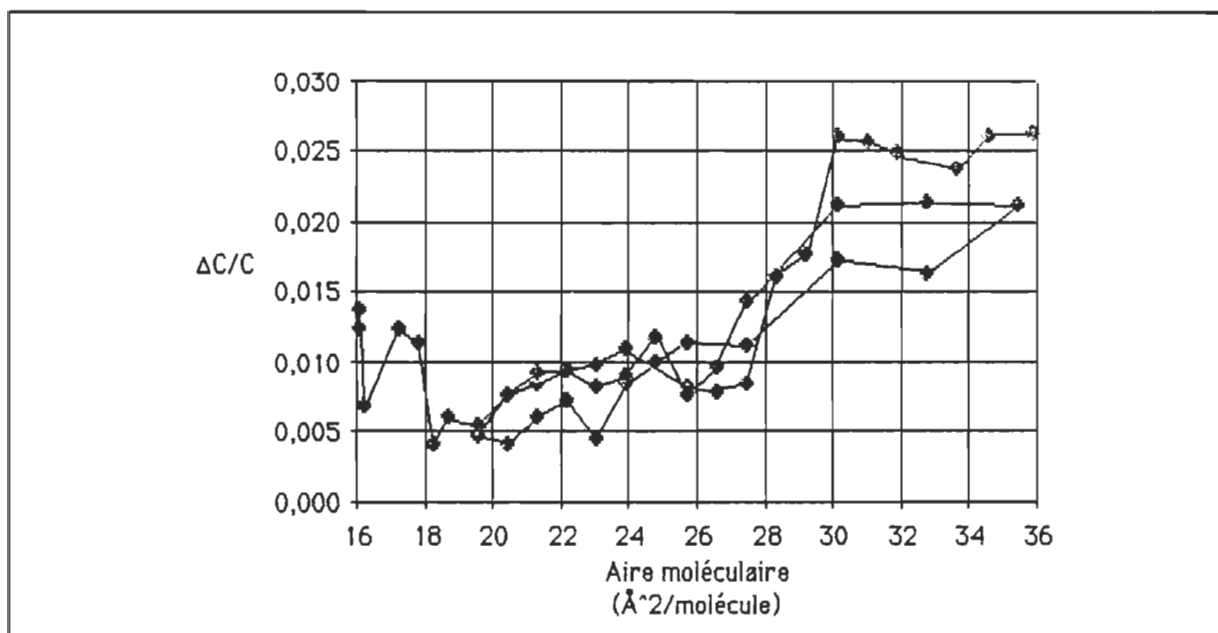


Figure 72. Fluctuations de la mesure de radioactivité de surface d'une monocouche d'acide octadécanoïque soumise à un cycle compression-expansion-compression. Ces valeurs sont les écarts maximaux de la mesure expérimentale par rapport à la valeur moyenne de 27 mesures de radioactivité. Les conditions expérimentales sont citées à la Fig. 71.

maximale relative à la moyenne est présentée à la Fig. 74. Il est évident que d'importantes modifications se produisent lorsque le film est dans un état relâché. Pour des valeurs de σ inférieures à $25 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$, les écarts maximaux sont de $\pm 5\%$, ce qui est raisonnable compte tenu de l'accroissement de l'incertitude provoquée par la réduction de la surface de détection sur le taux de compte. Pour des valeurs supérieures à $25 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$, des variations de plus de 67% sont enregistrées par rapport à la mesure moyenne. La Figure 75 rapporte les écarts maximaux relatifs mesurés pour l'ensemble des cycles compression-expansion menés avec des surfaces de détection de 25,5; 10,0; 5,7 et $1,0 \text{ cm}^2$. Il est notable qu'au-delà de $25 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$, aire qui correspond au point de montée de la pression de surface, les comptes mesurés sont très dispersés. Cette constatation est en bon accord avec l'idée

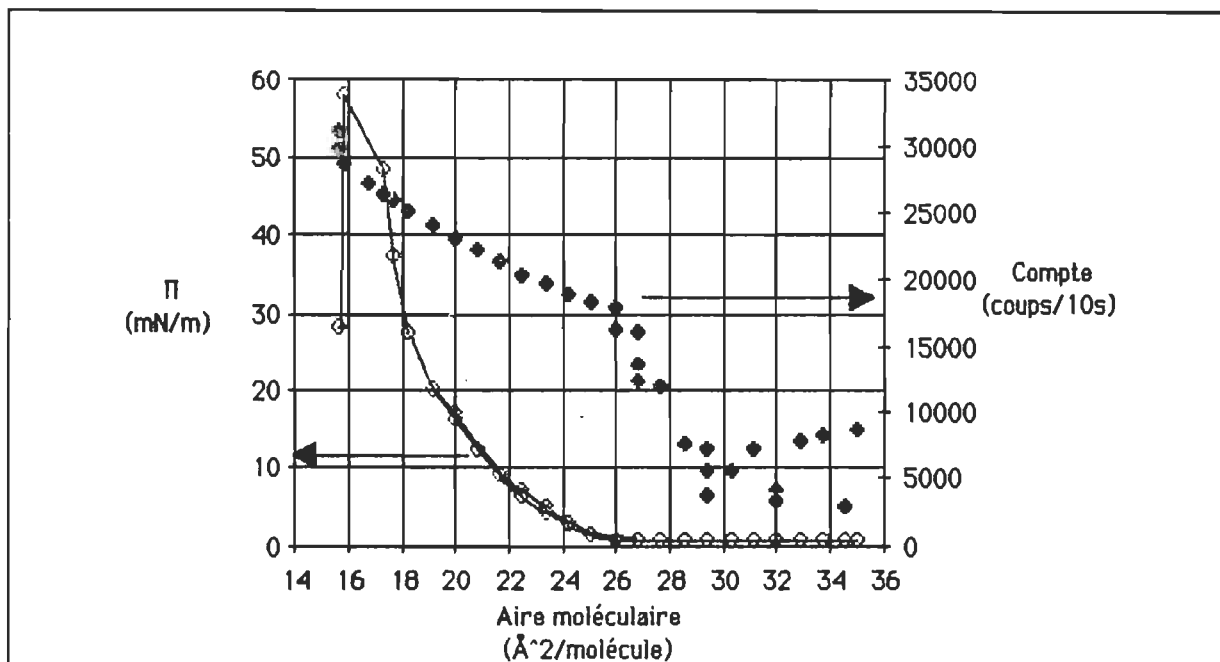


Figure 73. Isothermes Π - σ et Γ - σ de l'acide octadécanoïque étalé à l'interface air-Tampon phosphate 10^{-3}M , pH-7,0. Le film fut soumis à un cycle compression-expansion-compression. Les conditions expérimentales sont identiques à celles rapportées à la Fig. 71 sauf que la surface de la fenêtre est 1.0 cm^2 .

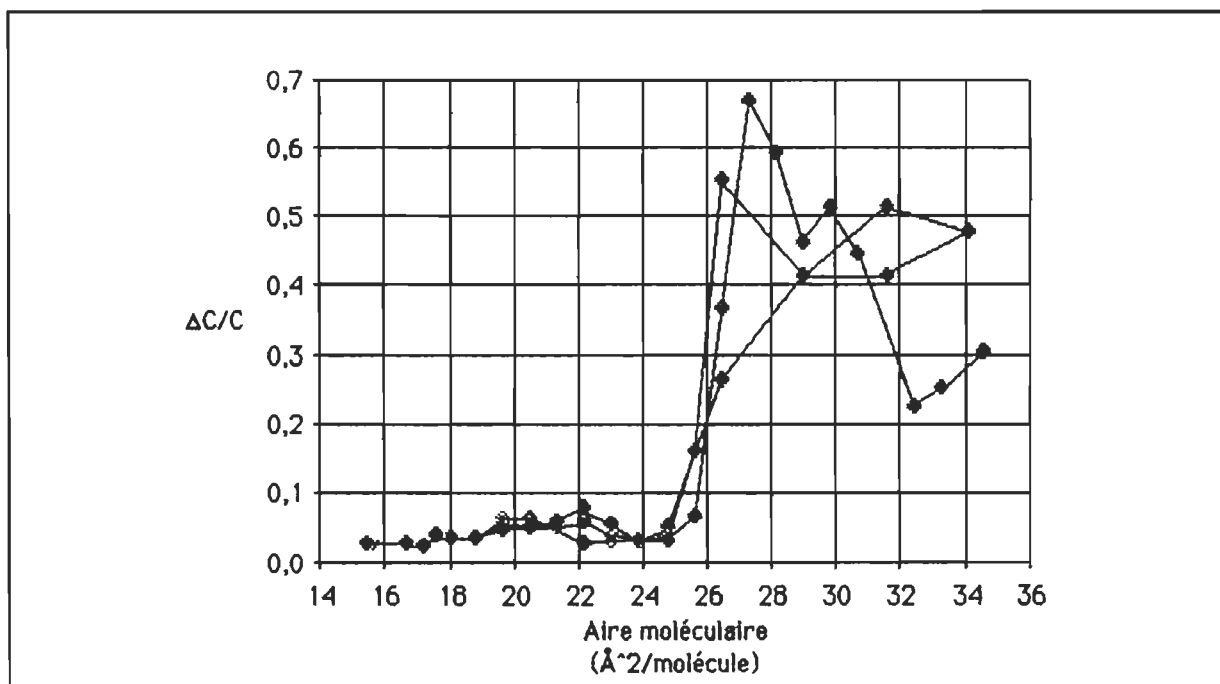


Figure 74. Ecart maximum relatif à la mesure de radioactivité de surface d'un film d'acide octadécanoïque soumis à un cycle compression-expansion-compression. Les conditions expérimentales sont rapportées à la Fig. 73.

rapportée par Cook et Ries (1956) qui veut que le film devienne homogène à partir du point où la compression donne naissance à une pression de surface significative. Deux constatations importantes découlent de ces résultats: 1) l'homogénéité du film peut être mise en cause pour des aires moléculaires supérieures à $25 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$ et 2) la détection de ce phénomène dépend de la surface du détecteur. L'inhomogénéité du film est-elle la seule hypothèse permettant d'expliquer ce phénomène?

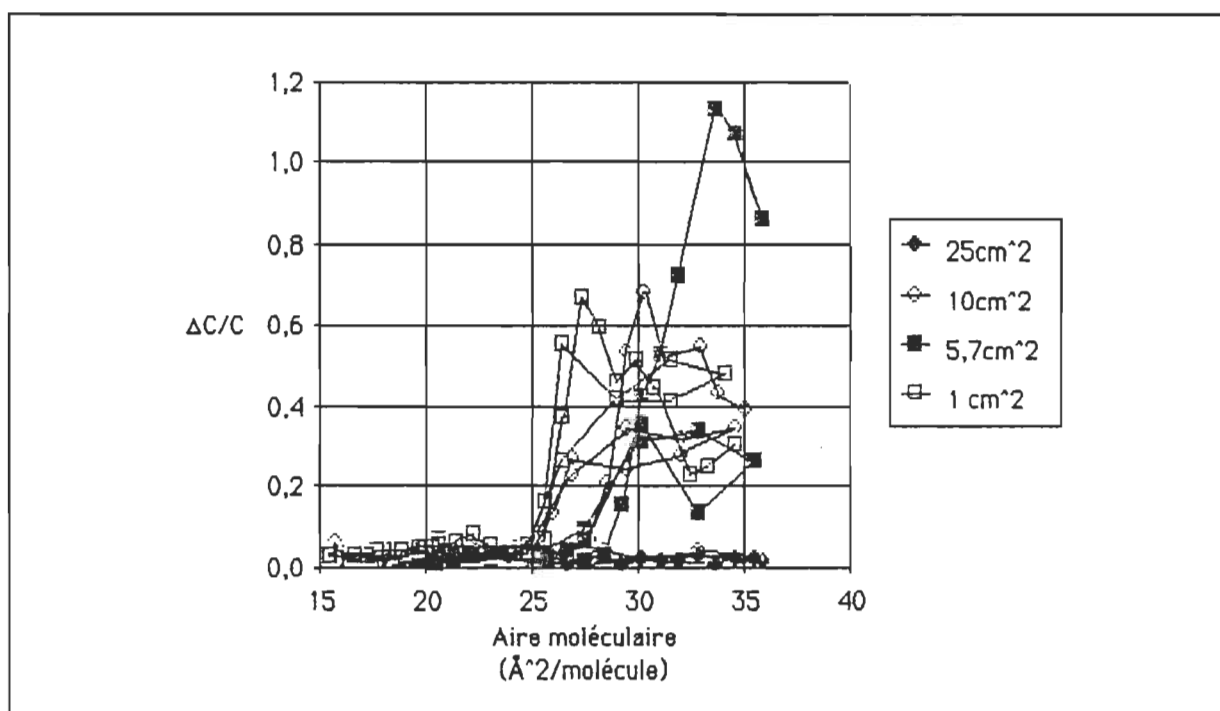


Figure 75. Représentation de l'écart maximal relatif au signal de radioactivité de surface d'un film de $[1-^{14}\text{C}]$ acide octadécanoïque pour diverses surfaces actives de fenêtre.

Avant de prendre en considération certains éléments pouvant expliquer l'origine de ces fluctuations, il est nécessaire de mentionner que notre système de mesure ne permet de détecter que le rayonnement émis directionnellement

depuis la monocouche vers le milieu aérien. Chaque molécule radioactive émet son rayonnement sur une sphère dont le radionucléide occupe le centre. Donc, en moyenne, 50 % du rayonnement est émis vers le haut, alors que 50 % du rayonnement est émis vers le bas. A cause de la faible énergie du β^- émis par le ^{14}C , la proportion du rayonnement émise en direction opposée au détecteur sera absorbée par l'eau et n'émergera jamais à la surface. Cette considération limite à 50 % le rendement théorique maximal du type de détecteur que nous utilisons.

La réduction de la radioactivité de surface constatée pour l'état relâché du film d'acide octadécanoïque peut avoir deux origines: 1) le rayonnement est absorbé soit par l'eau, soit par l'air séparant le détecteur de la source d'émission β^- ou 2) la monocouche est discontinue et des espaces dépourvus de substance se trouvent présents sous le détecteur; le signal sera proportionnel à la fraction du détecteur couverte par la matière radioactive. La validité de la première explication doit être mise en cause. Pour le rayonnement β^- d'énergie maximale de 0,156 MeV du ^{14}C , une épaisseur massique $_{1/2}$ d'environ 4,0 mg cm^{-2} doit être traversée afin que le rayonnement soit atténué de 50% (Neame et Homewood(1974)). Concrètement, cela signifie qu'un couloir ayant une section de 1 cm^2 et présentant une longueur telle que le volume comprenne 4,0 mg de matière atténue le rayonnement de moitié. Cette notion offre l'avantage d'être relativement indépendante de la densité de la matière absorbante considérée. Ainsi, pour l'eau, 40 μm de matière est suffisant afin de freiner 50% du rayonnement alors que plus de 40 mm d'air est requis afin d'effectuer la même atténuation. Qu'en est-il des atténuations observées pour

une monocouche d'acide octadécanoïque? Par rapport aux valeurs mesurées pour l'état homogène du film, nous mesurons des radioactivités qui correspondent parfois à moins de 25% de ce qui devrait être mesuré en considérant une répartition homogène de la monocouche à la surface de l'eau. Des atténuations du même ordre de grandeur sont présentées par Cook et Ries (1956). L'atténuation du signal à 25% de sa valeur originale correspond à la traversée de deux épaisseurs massiques_{1/2}, soit 80 μm d'eau ou 80 mm d'air, or le détecteur est positionné à 6 mm de l'interfacel!!! De plus il est impossible de concevoir qu'une couche d'eau, d'épaisseur équivalente à 3200 longueurs moléculaires d'acide octadécanoïque, couvre la couche monomoléculaire qui "flotte entre deux eaux." Pour ces raisons, nous rejetons l'effet atténuateur du milieu externe comme étant la source des fluctuations observées.

Attardons-nous à la signification de la mesure de radioactivité de surface. Pour des conditions d'opération données, le compte de radioactivité (C) est relié à la concentration interfaciale (Γ) par une constante de proportionnalité (K) qui tient compte des paramètres d'opération du détecteur (temps d'intégration, tension d'opération, seuil de discrimination, distance source-détecteur, débit de gaz, épaisseur massique du milieu aérien et de la fenêtre). Ainsi:

$$\Gamma = K C \quad (\text{A.1})$$

L'aire par molécule (A) est l'inverse de la concentration interfaciale, donc:

$$A = K' / C \quad (\text{A.2})$$

où K' vaut $1/K$. Comme nous calculons l'aire moléculaire moyenne par molécule (σ) à partir du nombre de molécules et de l'espace disponible à la surface du bain, nous devons, en portant en graphique $1/C$ vs σ , trouver une droite dont la pente vaut K' . La Figure 76 rapporte les graphiques $1/C$ - σ obtenus pour les quatre surfaces de détection et les valeurs de K' calculées pour l'ensemble des points qui se trouvent à des aires moléculaires inférieures à $25 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$. Les portions linéaires de ces graphiques interceptent l'origine à $\pm 2 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$. La relation directe entre la sensibilité du détecteur et sa surface est illustrée à la Fig. 77. Nous trouvons cette correspondance fort satisfaisante. Ainsi la correspondance entre l'aire moléculaire calculée à partir de l'Eq. 2.1 et la valeur mesurée par radioactivité de surface est excellente pour des aires moléculaires inférieures à $25 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$. Si l'atténuation du signal est une conséquence du dépouillement en molécules d'une partie de la surface active du détecteur, il nous est permis de calculer, en utilisant à l'inverse les valeurs de K' et la radioactivité mesurée, l'aire moléculaire moyenne mesurée pour divers états de compression du film. Cette démarche est illustrée à la Fig. 78 où nous avons comparé les valeurs calculées et mesurées d'aires moléculaires. Comme nous devons nous y attendre, la relation est excellente pour des valeurs de σ inférieures à $25 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$. Pour des valeurs supérieures de σ , il est surprenant de constater que des aires moléculaires de $150 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$ sont mesurées alors qu'elles ne sont estimées qu'à $35 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$ en utilisant l'Eq. 2.1. Ainsi, 20% de la surface présente sous le détecteur serait constituée de molécules alors que 80 % de la surface en serait dépourvue. Dans certains cas extrêmes, nous mesurons que seulement 10 % de la surface est

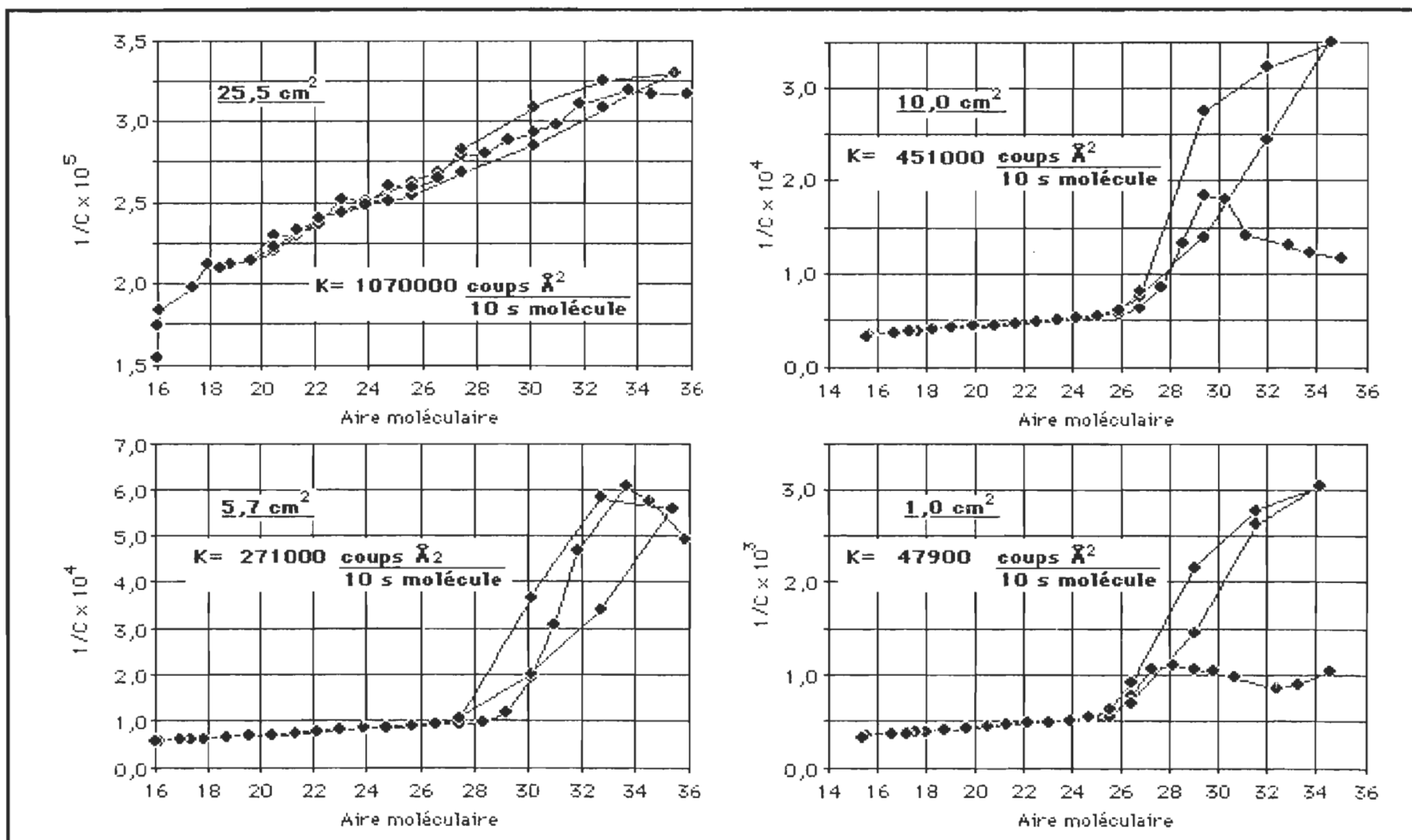


Figure 76. Relations entre $1/C$ et σ d'une monocouche d'acide octadécanoïque mesurées pour des surfaces de fenêtre de 25,5; 10,0; 5,7 et 1,0 cm^2 . Les pentes K' furent calculées pour la portion linéaire du graphique, lorsque $\sigma < 25 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$.

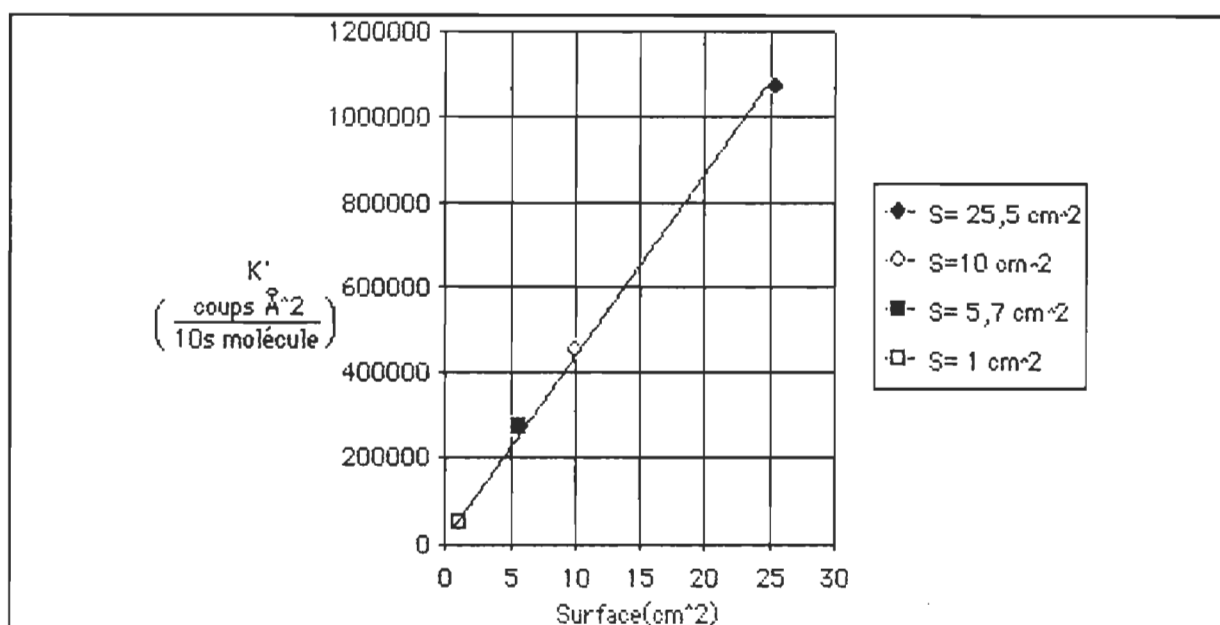


Figure 77. Relation entre le paramètre de sensibilité (K') et la surface active de la fenêtre du détecteur. La relation linéaire démontre que le système est proportionnel et qu'il est opéré hors des conditions de saturation.

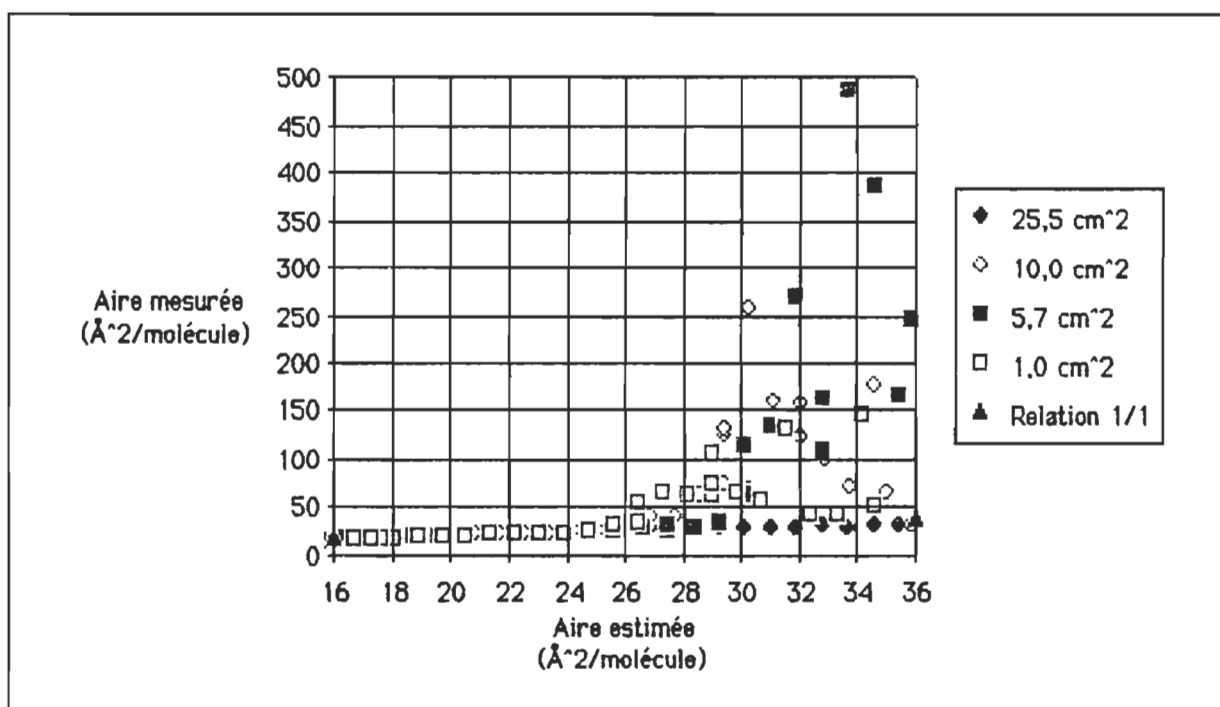


Figure 78. Comparaison entre les aires mesurées par radioactivité de surface et les aires moléculaires moyennes estimées de l'acide octadécanoïque pour un étalement homogène à l'interface air-eau. Une droite indique la correspondance parfaite entre les valeurs calculées et mesurées (Relation 1/1).

occupée par le film. Ces résultats mettent en relief toute la problématique des changements qui surviennent dans l'organisation d'un film qui passe de l'état relâché vers l'état condensé.

A ce point, nous ne reconnaissons que le modèle du film discontinu comme valable. Cependant, nous devons avouer notre impuissance à formuler un modèle permettant d'expliquer une réduction effective de l'aire moléculaire moyenne d'un facteur cinq alors que l'aire moléculaire estimée n'est décriue que de quelques \AA^2 molécule⁻¹. Comme cette étude est une digression à notre propos de thèse, nous n'avons pas poussé plus loin les expériences. Nous nous permettons cependant de souligner le grand intérêt que pourrait présenter une étude exhaustive et systématique d'un tel système; la majorité des lipides de même que la chlorophylle a présentent des sauts de potentiel de surface et du déphasage ellipsométrique au point de montée (Ducharme (1987)). Nous avons des raisons de croire que ces sauts traduisent la même manifestation du phénomène observé par radioactivité de surface.

A.3 L'isotherme de déphasage ellipsométrique-aire moléculaire de l'acide octadécanoïque

L'ellipsométrie de surface est une technique optique non-destructive qui permet d'étudier le changement d'état de polarisation d'un faisceau lumineux réfléchi à l'interface air-eau. Le lecteur intéressé pourra trouver une

description complète de l'utilisation de l'ellipsométrie à l'interface air-eau afin de caractériser les films minces dans la thèse de Ducharme (1987). Le changement d'état de polarisation mesuré suite à la réflexion à l'interface air/film mince/eau d'un faisceau lumineux polarisé elliptiquement dépend de plusieurs paramètres, notamment, l'épaisseur du film (d). Comme la radioactivité de surface nous renseigne sur la concentration bidimensionnelle de la monocouche, l'ellipsométrie apparaît un complément idéal permettant d'obtenir une information volumétrique complémentaire à la section moléculaire, c'est-à-dire l'épaisseur.

A.3.1 Correspondance entre les isothermes de pression et d'ellipsométrie de surface. Les mesures de pression de surface et de déphasage ellipsométrique dépeignent des propriétés physiques différentes du film monomoléculaire. La pression de surface concerne une propriété mécanique du film alors que l'ellipsométrie permet la caractérisation d'une propriété optique. Elles sont cependant toutes deux affectées par l'état de compression du film. La Fig. 79 présente les isothermes Π - σ et $-\delta\Delta$ - σ obtenues pour un film d'acide octadécanoïque soumis à une compression simple. L'isotherme ellipsométrique présente les points expérimentaux obtenus pour quatre isothermes distinctes. Nous n'avons pas moyenné ces valeurs afin d'illustrer la variation de cette mesure pour différents états de compression.

Il est impossible de mesurer la valeur de $\delta\Delta$ pour des aires moléculaires supérieures à $30 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$. La procédure expérimentale de détermination de $\delta\Delta$ requiert la détermination de la position de l'analyseur et du polariseur

dans les deux zones permettant l'extinction du faisceau. Le temps requis afin de compléter la mesure étant d'environ cinq minutes, il est essentiel que, durant la mesure des positions du polariseur et de l'analyseur, la nature du film présent sous le faisceau demeure la même. Tout changement significatif dans la nature du film présent au point de réflexion entraîne l'impossibilité de déterminer les azimuths correspondant à l'extinction. Avec les mesures de radioactivité de surface, cette observation est le second indice qui confirme la nature inhomogène du film dans l'état relâché.

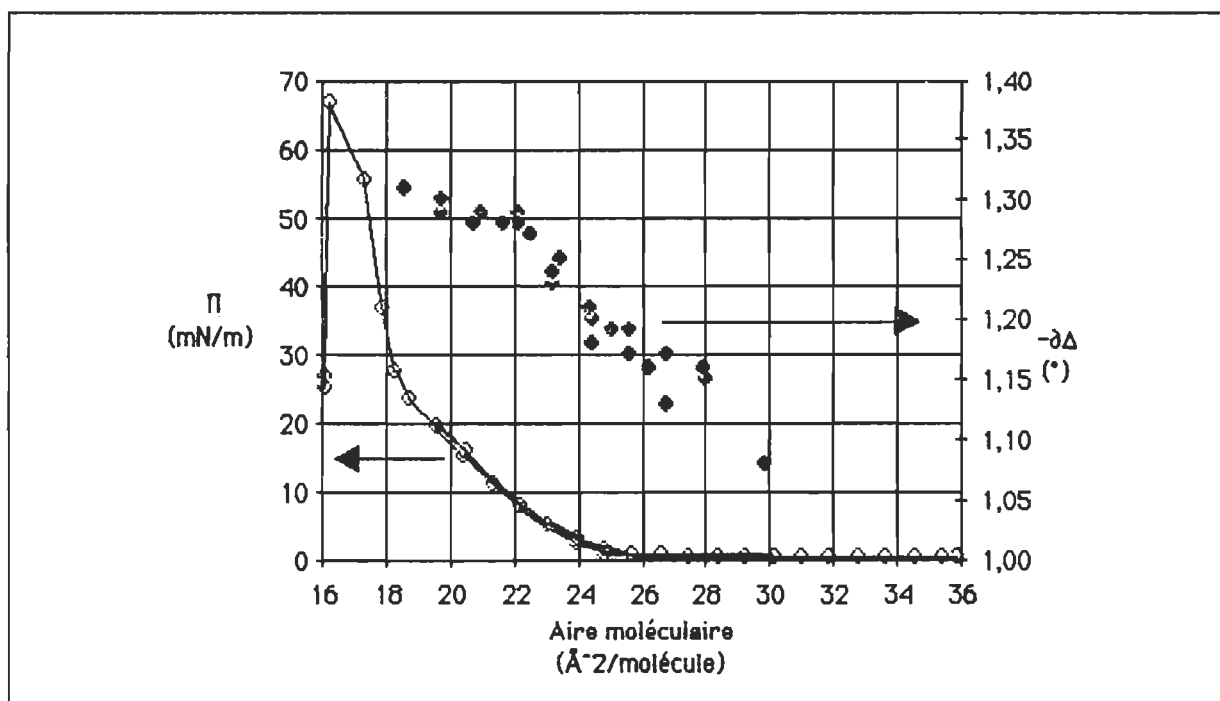


Figure 79. Isothermes Π - σ et $-\delta\Delta$ - σ obtenues pour l'acide octadécanoïque étalé à l'interface air-tampon phosphate 10^{-3}M , $\text{pH}=7,0$ à $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Conditions d'opération de l'ellipsomètre: $\phi=60^\circ$, $\lambda=6328 \text{\AA}$. L'incertitude sur la mesure de $\delta\Delta$ est de $\pm 0,04^\circ$.

A des aires moléculaires légèrement supérieures au point de montée de la pression de surface, nous obtenons une isotherme ellipsométrique où $|\delta\Delta|$

s'accroît jusqu'à une valeur de $1,29^\circ$ et donne, par la suite, un plateau ($-1,29 \pm \delta\Delta \pm 1,31^\circ$) jusqu'à un σ de $18,5 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$, aire qui correspond à la limite de l'état monomoléculaire du film. Nous avons mentionné que pour des pressions de surface supérieures à 25 mN m^{-1} , le film est instable et la pression de surface chute lorsque la compression est interrompue. A cette diminution de pression de surface correspond une augmentation de $|\delta\Delta|$.

A.3.2 Comparaison avec les valeurs de la littérature. A notre connaissance, aucune isotherme ellipsométrique de l'acide octadécanoïque étalé à l'interface air-eau n'a, jusqu'à maintenant, été rapportée dans la littérature. Par contre, les isothermes $\delta\Delta$ - σ des acides tétradécanoïque et éicosanoïque furent rapportées par Den Engelsen et De Koning (1974). Dans un article subséquent, Den Engelsen (1976) rapporte une valeur expérimentale de $\delta\Delta$ de $-1,22^\circ$ pour l'acide octadécanoïque; cette valeur correspond apparemment à la valeur au plateau mesurée pour l'état condensé du film. Il ressort déjà une discordance entre les résultats de Den Engelsen et les nôtres. Cet auteur rapporte une valeur de $\delta\Delta$ au plateau de $0,07^\circ$ supérieure à celle que nous trouvons. Une différence de $+0,06^\circ$ est également rapportée pour l'acide éicosanoïque par Ducharme (1987). Cet écart peut être en grande partie expliqué par une différence dans l'angle d'incidence du faisceau; Den Engelsen utilise une valeur de $\phi=60,2^\circ$ alors que nous avons travaillé avec un ϕ de $60,0 \pm 0,05^\circ$. Cette différence est garante d'un écart de $\delta\Delta$ de $+0,04^\circ$ (référer à l'Eq. A.3). Comme l'erreur expérimentale de la mesure est de $\pm 0,04^\circ$, nous croyons que la différence restante de $0,03^\circ$ est acceptable.

A.3.3 Simulation de l'isotherme ellipsométrique de l'acide octadécanoïque.

Le changement de phase des composantes lente et rapide du faisceau lumineux, suite à sa réflexion sur un film mince qui présente une anisotropie optique uniaxiale, dépend de deux paramètres optiques, n_x et n_z , et d'un paramètre physique, d . Les paramètres n_x et n_z représentent les indices de réfraction du film respectivement dans le plan de l'interface et selon l'axe perpendiculaire à ce plan, alors que d est l'épaisseur du film. Il est important de mentionner que les indices de réfraction n_x et n_z font référence aux propriétés optiques du film sans prendre en considération l'orientation des molécules constitutives. De plus, ce modèle prévoit que les interfaces lipide-eau et lipide-air sont discontinues. Ces variables sont reliées à $\delta\Delta$ par la relation (Ducharme (1987)):

$$\delta\Delta = \frac{4 \pi d \cos \phi \sin \phi n_2^2 M}{\lambda (n_2^2 - 1) (\sin^2 \phi - n_2^2 \cos^2 \phi)} \quad (\text{A.3})$$

où ϕ et λ sont respectivement l'angle d'incidence ($60,0^\circ$) et la longueur d'onde (6328 \AA) du faisceau lumineux ; n_2 , l'indice de réfraction du substrat (1,332) et M est défini comme étant:

$$M = 1 + n_2^2 - n_x^2 - (n_2^2 / n_z^2) \quad (\text{A.4})$$

Il est impossible de résoudre cette équation à partir de la simple détermination de $\delta\Delta$. Pour ce faire, il faut établir des critères permettant de sélectionner des solutions "raisonnables". La première de ces conditions limites concerne l'état condensé du film monomoléculaire. Nous avons mentionné qu'au voisinage de 25 mN m^{-1} , endroit où l'isotherme de pression de surface

présente une inflexion, l'aire moléculaire est voisine de l'aire rencontrée pour les molécules analogues dans les solides tridimensionnels. Il est donc raisonnable de supposer que, dans cet état, l'épaisseur du film est équivalente à la longueur moléculaire. Donc la valeur de $\delta\Delta$ mesurée au plateau, là où les axes moléculaires et optiques se confondent, dépend directement de la valeur de la longueur moléculaire, l , et des indices de réfraction intrinsèques, n_{0x} et n_{0z} . Il est ainsi possible en fixant l de déterminer les couples (n_{0x} , n_{0z}) donnant une valeur de $\delta\Delta$ égale à la valeur mesurée au plateau.

Le choix de l n'est pas simple et direct. Le modèle servant à découler les Eqs. A.3 et A.4 considère une superposition des milieux ayant des indices de réfraction différents et présentant des discontinuités aux interfaces. Le système expérimental présente sûrement des interfaces qui ne sont pas discontinues. La véritable question se résume ainsi: Quelle-est la portion de la molécule qui contribue à la valeur de $\delta\Delta$? Est-ce que toute la molécule contribue au déphasage ellipsométrique? La polarité de la tête polaire combinée à son interaction avec l'eau peut-elle faire en sorte que la longueur effective mesurée soit moindre que la longueur moléculaire? Nous n'avons pas la prétention de pouvoir résoudre cette problématique. Cependant, afin de ne pas négliger l'importance de ce paramètre, nous utiliserons ultérieurement des valeurs de l comprises entre 21 et 23 Å. Ces valeurs correspondent à la longueur de la molécule d'acide octadécanoïque dont nous avons retranché le groupement carboxyle (23 Å) ou le groupement carboxyle et le méthyle qui est voisin (21 Å). Cette procédure est justifiée par la grande polarité du groupement carboxyle (qui se rapproche plus de l'eau que de la chaîne

hydrocarbonée) et de la possibilité qu'a le méthyle voisin de se trouver dans la sphère d'hydratation du carboxyle (Nagarajan et Ruckenstein (1977)).

Nous avons déterminé l'ensemble des couples (n_x , n_z) qui donnent des valeurs de $\delta\Delta$ comprises entre $-1,29$ et $-1,31^\circ$. Pour ce faire, nous avons augmenté successivement n_x et n_z de 1,400 à 1,700 par incrément de 0,002 en considérant des l valant 21, 22 ou 23 Å. Nous avons ainsi pu identifier plus de 217 couples rencontrant les conditions précitées. Les solutions obtenues pour des longueurs de 21 et 23 Å sont citées au Tableau 11. Nous sommes conscients que ces solutions sont partielles et dépendent de la précision des n_x , n_z et l que nous avons considéré. Pour le cas qui nous intéresse, nous croyons que cette précision de $\pm 0,002$ sur n et de ± 1 Å sur l est suffisante. Certes, nous avons restreint les solutions possibles mais il nous faut établir de nouveaux critères permettant de vérifier la validité des solutions identifiées. Il faut maintenant se tourner vers la relation existant entre l'orientation et l'aire moléculaire.

A.3.3.1 Modèles corrélant l'orientation et l'aire moléculaire. Les modèles reliant l'orientation θ de la chaîne aliphatique et l'aire moléculaire sont nécessaires afin de nous permettre de vérifier la validité des solutions identifiées précédemment. Des trois modèles que nous avons envisagés, il en est un dynamique qui prévoit le mouvement de la chaîne hydrocarbonée et deux autres, plus statiques, qui considèrent la molécule comme un simple solide qui se redresse en cours de compression.

Tableau 11. Liste des couples (n_x, n_z) compris entre (1,4;1,4) et (1,7;1,7) qui donnent un déphasage ellipsométrique compris entre $-1,29$ et $-1,31^\circ$ pour des longueurs de chaîne de 21 et 23 Å. Les valeurs de n_x et n_z furent successivement incrémentées de 0,002.

Longueur = 21 Å			Longueur = 23 Å		
n_x	n_z	$n_z - n_x$	n_x	n_z	$n_z - n_x$
1,436	1,400	-0,036	1,430	1,400	-0,030
1,438	1,404	-0,034	1,432	1,404	-0,028
1,440	1,408	-0,032	1,434	1,408	-0,026
1,442	1,412	-0,030	1,436	1,412	-0,024
1,444	1,418	-0,026	1,438	1,416	-0,022
1,446	1,422	-0,024	1,438	1,418	-0,020
1,448	1,426	-0,022	1,440	1,422	-0,018
1,448	1,428	-0,020	1,442	1,426	-0,016
1,450	1,432	-0,018	1,444	1,432	-0,012
1,452	1,436	-0,016	1,446	1,436	-0,010
1,454	1,442	-0,012	1,448	1,440	-0,008
1,456	1,446	-0,010	1,450	1,446	-0,004
1,458	1,450	-0,008	1,452	1,450	-0,002
1,458	1,452	-0,006	1,454	1,456	0,002
1,460	1,456	-0,004	1,456	1,460	0,004
1,462	1,462	0,000	1,458	1,466	0,008
1,464	1,466	0,002	1,460	1,470	0,010
1,466	1,472	0,006	1,460	1,472	0,012
1,468	1,476	0,008	1,462	1,476	0,014
1,468	1,478	0,010	1,464	1,482	0,018
1,470	1,482	0,012	1,466	1,486	0,020
1,472	1,488	0,016	1,466	1,488	0,022
1,474	1,492	0,018	1,468	1,492	0,024
1,474	1,494	0,020	1,470	1,498	0,028
1,476	1,498	0,022	1,472	1,504	0,032
1,476	1,500	0,024	1,474	1,510	0,036
1,478	1,504	0,026	1,476	1,514	0,038
1,478	1,506	0,028	1,476	1,516	0,040
1,480	1,510	0,030	1,478	1,520	0,042
1,482	1,516	0,034	1,478	1,522	0,044
1,484	1,522	0,038	1,480	1,526	0,046
1,486	1,528	0,042	1,480	1,528	0,048
1,488	1,534	0,046	1,482	1,532	0,050
1,490	1,540	0,050	1,482	1,534	0,052
1,492	1,546	0,054	1,484	1,538	0,054
1,494	1,552	0,058	1,484	1,540	0,056
1,496	1,558	0,062	1,486	1,544	0,058
1,496	1,560	0,064	1,486	1,546	0,060
1,498	1,564	0,066	1,488	1,550	0,062
1,498	1,566	0,068	1,488	1,552	0,064
1,500	1,572	0,072	1,490	1,558	0,068
1,502	1,578	0,076	1,492	1,564	0,072
1,504	1,584	0,080	1,494	1,570	0,076

Tableau 11 (Suite).

Longueur - 21 Å			Longueur - 23 Å		
n_x	n_z	$n_z - n_x$	n_x	n_z	$n_z - n_x$
1,504	1,586	0,082	1,496	1,576	0,080
1,506	1,592	0,086	1,496	1,578	0,082
1,508	1,598	0,090	1,498	1,584	0,086
1,508	1,600	0,092	1,500	1,590	0,090
1,510	1,604	0,094	1,500	1,592	0,092
1,510	1,606	0,096	1,502	1,596	0,094
1,512	1,612	0,100	1,502	1,598	0,096
1,512	1,614	0,102	1,504	1,604	0,100
1,514	1,620	0,106	1,506	1,610	0,104
1,516	1,626	0,110	1,506	1,612	0,106
1,516	1,628	0,112	1,508	1,618	0,110
1,518	1,634	0,116	1,508	1,620	0,112
1,518	1,636	0,118	1,510	1,626	0,116
1,520	1,642	0,122	1,512	1,632	0,120
1,520	1,644	0,124	1,512	1,634	0,122
1,522	1,650	0,128	1,514	1,640	0,126
1,524	1,656	0,132	1,514	1,642	0,128
1,524	1,658	0,134	1,516	1,648	0,132
1,526	1,664	0,138	1,518	1,656	0,138
1,526	1,666	0,140	1,520	1,662	0,142
1,528	1,672	0,144	1,520	1,664	0,144
1,528	1,674	0,146	1,522	1,670	0,148
1,530	1,680	0,150	1,522	1,672	0,150
1,530	1,682	0,152	1,524	1,678	0,154
1,532	1,688	0,156	1,524	1,680	0,156
1,532	1,690	0,158	1,526	1,688	0,162
1,532	1,692	0,160	1,528	1,696	0,168
1,534	1,698	0,164	1,528	1,698	0,170
1,534	1,700	0,166			

A) Le modèle du cône. Un des modèles simples envisagés définit l'aire moléculaire comme la section décrite, sur le plan de l'interface, par le mouvement de précession de la chaîne hydrocarbonée autour de l'axe z normal à ce plan (Cadenhead (1985)). Une représentation schématique de ce modèle est donnée à la Fig. 80. Afin de pouvoir considérer l'espace mort compris

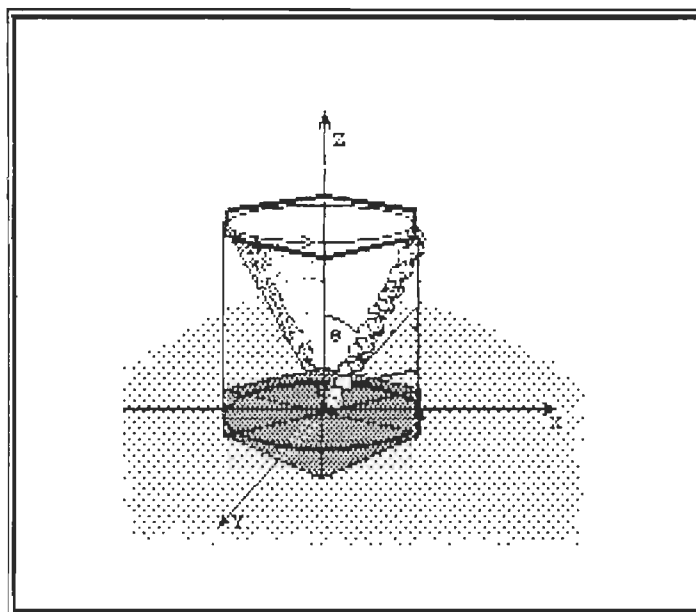


Figure 80. Représentation schématique du modèle du cône. La molécule, en décrivant un mouvement de précession autour de l'axe z, définit un cercle de diamètre d' . Afin de considérer les espaces intercalaires présents entre les cercles, le cercle fut inscrit dans un hexagone.

entre les molécules, le cercle décrit par la précession de la chaîne est inscrit dans un hexagone. Nous définissons a comme la longueur des facettes d'un hexagone qui englobe la section moléculaire d'une chaîne grasse redressée ($\sigma = 18,5 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$ à $\theta = 0^\circ$). L'aire moléculaire calculée selon ce modèle est donnée par:

$$\sigma = \frac{3\sqrt{3}}{2} \left[\frac{2}{\sqrt{3}} L_{cc} \sin \theta + a \right]^2 \quad (\text{A.5})$$

et l'épaisseur d du film est donnée par:

$$d = [L_{cc} \cos \theta] + \sqrt{3} a \quad (\text{A.6})$$

où L_{cc} est la longueur de la molécule dont on a soustrait un diamètre moléculaire. Cette formulation de l'épaisseur, qui est un peu plus complexe

que la simple projection de la hauteur d'un parallélépipède sur l'axe z, évite de considérer le passage des arêtes lors du redressement du solide englobant la chaîne hydrocarbonée. Dans cette formulation, les extrémités supérieures du solides ont été arrondies. Nous sommes maintenant en mesure de déterminer la relation reliant σ et θ pour le modèle considéré. Il ne nous reste plus qu'à décrire la relation unissant les indices de réfraction n_x et n_z aux valeurs moléculaires intrinsèques n_{ox} et n_{oz} en fonction de l'orientation θ . Ces relations furent déjà rapportées par Den Engelsen (1974) et valent:

$$n_x = n_y = \sqrt{1/2 (1 + \cos^2 \theta) n_{ox}^2 + (\sin^2 \theta) n_{oz}^2} \quad (A.7)$$

$$n_z = \sqrt{(\sin^2 \theta) n_{ox}^2 + (\cos^2 \theta) n_{oz}^2} \quad (A.8)$$

Nous avons fait plusieurs tentatives de simulation de l'isotherme ellipsométrique expérimentale en utilisant les Eqs A.5 et A.6 pour calculer l'aire moléculaire et l'épaisseur du film, les Eqs A.7 et A.8 afin de déterminer les indices de réfractons du film à partir de l'orientation des molécules constituantes et les Eqs A.3 et A.4 afin de calculer les déphasages ellipsométriques correspondants. Afin d'illustrer cette démarche, nous présentons au Tableau 12 les résultats obtenus par calcul en considérant deux cas extrêmes d'anisotropie alors que la valeur de l considérée est de 23 Å.

Nous pouvons constater que le comportement des deux solutions est fort différent. Dans le premier cas, il y a une décroissance de $|\delta\Delta|$ lorsque σ diminue alors que pour la seconde solution la compression donne lieu à une

Tableau 12 Résultats obtenus par simulation de l'isotherme ellipsométrique de l'acide octadécanoïque en considérant une longueur de chaîne de 23 Å. Ce tableau présente les résultats obtenus pour deux cas extrêmes; les anisotropies des première et seconde solutions sont respectivement -0,014 et +0,090. La valeur de a considérée est de 2,667 Å.

θ (°)	σ (Å ² molécule ⁻¹)	d (Å)	$n_{ox}=1,430$ $n_{oz}=1,416$	$n_{ox}=1,500$ $n_{oz}=1,590$
			$\delta\Delta$ (°)	$\delta\Delta$ (°)
0	18,5	23	-1,310	-1,303
5	57,7	22,9	-1,303	-1,311
10	118,2	22,7	-1,281	-1,334
15	198,6	22,4	-1,245	-1,371
20	297,3	21,9	-1,198	-1,417
25	411,8	21,2	-1,139	-1,468
30	539,2	20,5	-1,071	-1,518
35	676,3	19,7	-0,996	-1,563
40	819,4	18,6	-0,916	-1,595

augmentation de $|\delta\Delta|$. Ce comportement sera traité plus en détail ultérieurement. A la lueur de ces résultats, nous devons toutefois conclure que ce modèle est impuissant à fournir une simulation valable des résultats expérimentaux. Dans le meilleur des cas, lorsque l'aire passe de 18,5 à 57,7 Å² molécule⁻¹ (θ passe de 0 à 5°), la valeur de $\delta\Delta$ passe seulement de -1,31 à -1,30°. Pour les raisons d'instabilité précitées, la valeur expérimentale de $\delta\Delta$ à 57,7 Å² molécule⁻¹ est inaccessible. Nous pouvons tout de même citer que la valeur mesurée à 30 Å² molécule⁻¹ (selon ce modèle, $\theta = 1,5^\circ$) est voisine de -1,10°. L'incapacité de ce modèle à simuler l'isotherme expérimentale repose sur le fait que la variation de σ est très élevée pour de faibles changements de θ . Nous avons donc entrepris de vérifier la validité d'un second modèle, plus statique que le premier.

B) *Le modèle du parallélépipède* Dans ce modèle, nous considérons que la molécule, qui adopte sa conformation tout-trans, s'inscrit dans un parallélépipède de section carrée de diamètre d' . Une représentation simplifiée du modèle qui sert à relier l'orientation de la molécule (θ) et l'aire moléculaire est présentée à la Figure 81. La section du solide est choisie afin de rencontrer une section du solide égale à $18,5 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$ lorsque le grand axe est vertical. Pour des angles inférieures à θ_{lim} , où θ_{lim} est l'angle maximal auquel la molécule peut s'incliner, l'aire moléculaire est donnée par:

$$\sigma = d' (d' / \cos \theta) \quad (\text{A.9})$$

et l'épaisseur d par:

$$d = (L_{\text{cc}} \cos \theta) + d' \quad (\text{A.10})$$

où d' , le diamètre de la molécule est fixé à $4,3 \text{ Å}$. Les conditions particulières relatives à l'état où l'axe moléculaire possède une orientation voisine de 90° (et aussi de θ_{lim}) ne seront pas abordées ici. Nous suggérons au lecteur intéressé de consulter la thèse de D.Ducharme (1987).

Les isothermes $\delta\Delta$ - σ obtenues pour diverses solutions présentées au Tableau 12, en considérant un l de 23 Å , sont présentées à la Figure 82. Ce résultat apporte des informations intéressantes car il permet de conclure que la forme de l'isotherme simulée est fortement déterminée par l'anisotropie. Pour des anisotropies négatives, l'isotherme présente une descente continue de $|\delta\Delta|$ lorsque σ s'accroît. Pour des anisotropies fortement positives, nous trouvons une isotherme de forme différente montrant d'abord une montée,

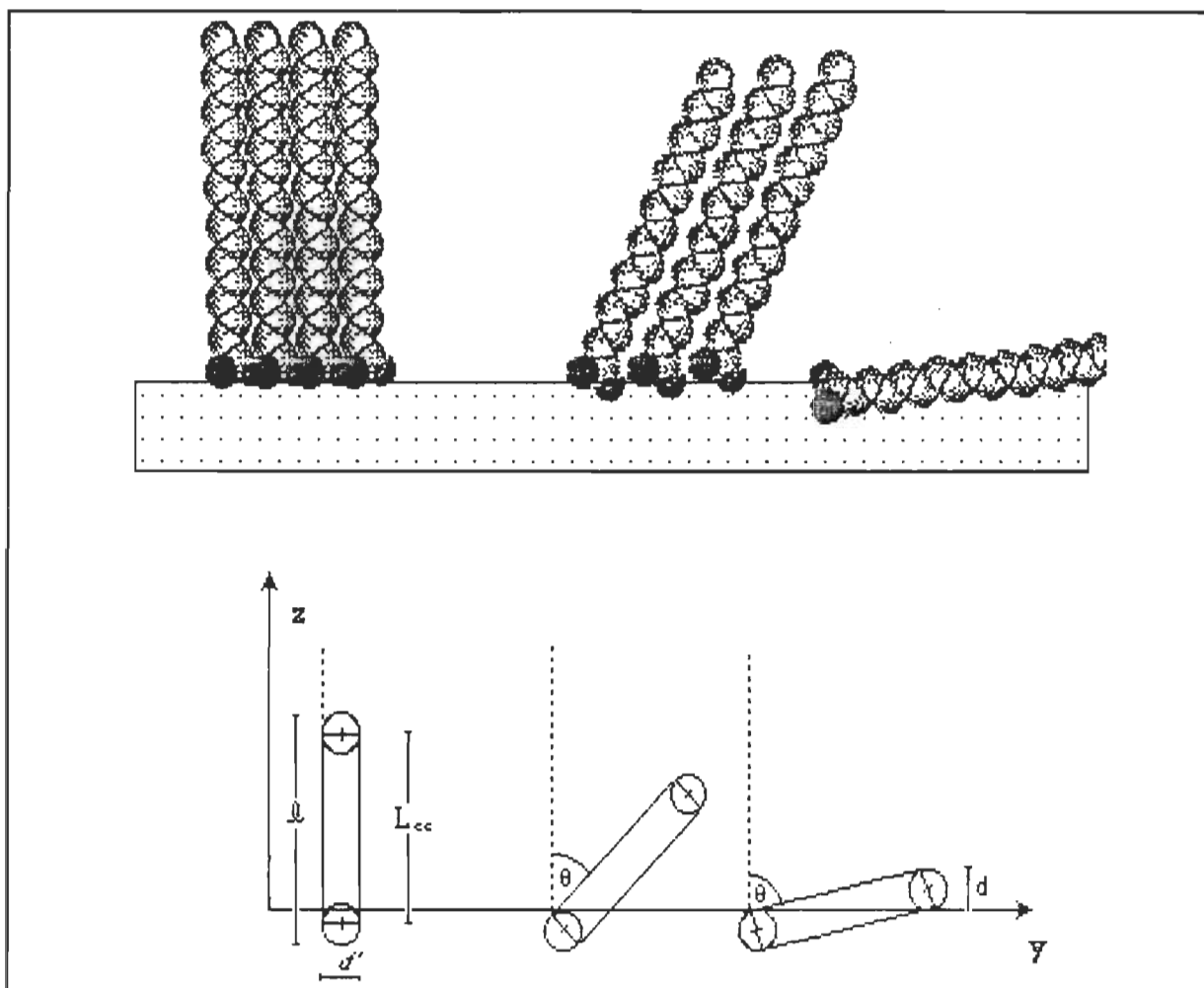


Figure 81. Représentation schématique du redressement d'une molécule d'acide gras à l'interface air-eau. Deux versions de ce modèle furent considérées; la première inclut la section du solide dans un carré de diamètre d' alors que la seconde version considère un hexagone dont les facettes sont de longueur a .

suivie d'une descente de $|\delta\Delta|$ lorsque σ augmente. Comme nous le verrons plus loin, certaines solutions intermédiaires présentent des valeurs et une forme se rapprochant beaucoup des isothermes mesurées expérimentalement.

Nous nous permettons de glisser un mot concernant une étude théorique effectuée par Den Engelsen (1976). En utilisant le modèle de la cavité de Lorentz, cet auteur parvint en considérant des valeurs de l de 24,5 Å, $\sigma=19$ Å²

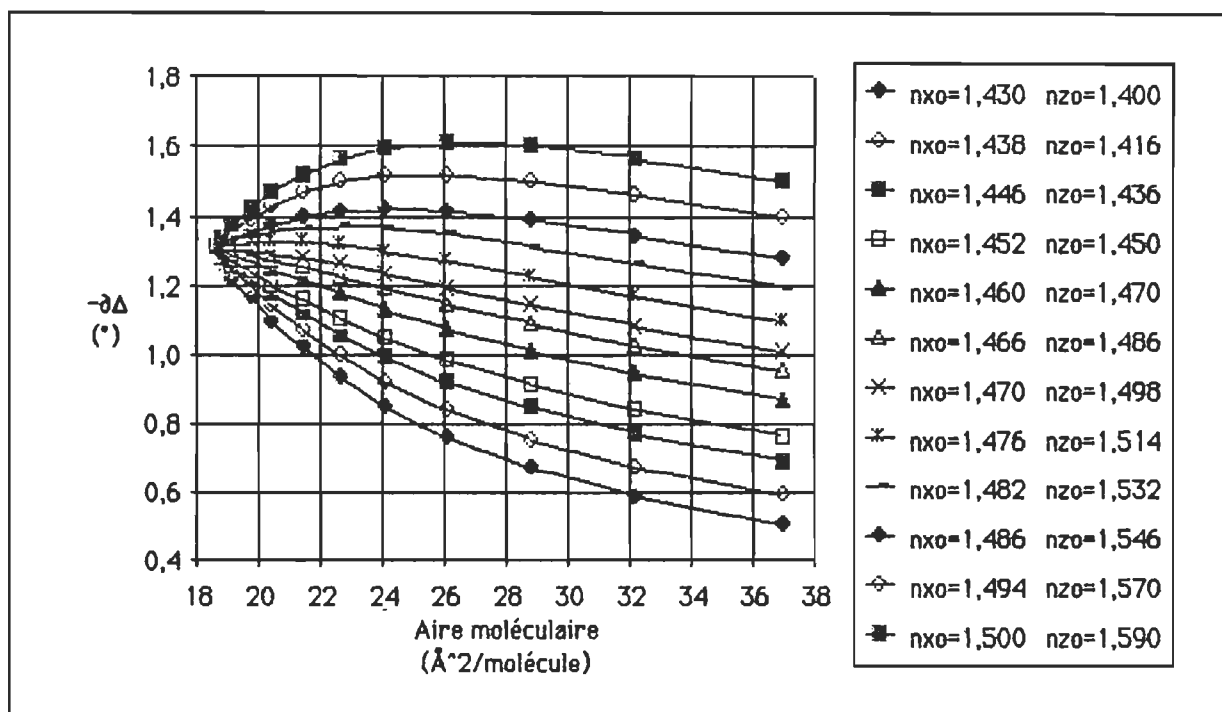


Figure 82. Isothermes simulées $\delta\Delta$ - σ en considérant le modèle du parallélépipède pour des couples (n_{ox}, n_{oz}) dont l'anisotropie est comprise entre -0,30 et 0,90. Dans ce cas, une longueur de chaîne Q -23 Å, un diamètre d' -4,3Å et un L_{cc} de 18,7 Å furent considérés.

et des valeurs de polarisabilité rapportées dans la littérature, à calculer des indices de réfraction intrinsèques théoriques de (1,484; 1,559). Il est vrai que ces valeurs sont en accord avec la valeur de $\delta\Delta$ rapportée pour le film présent au maximum de compression. En observant la Fig. 82, nous constatons que cette solution, qui possède une anisotropie voisine de +0,075 (voir $n_{x0}=1,494$ et $n_{z0}=1,570$), présente un comportement fort différent de celui observé pour l'isotherme expérimentale. Quoiqu'elle donne une valeur au plateau raisonnable, cette solution théorique n'est pas en accord avec l'isotherme expérimentale mesurée. Il faut ajouter que cet auteur n'a vérifié la validité de cette solution que pour l'inclinaison $\theta=0^\circ$.

Les solutions identifiées au Tableau 11 qui se rapprochent le plus de l'isotherme expérimentale possèdent des anisotropies voisines de 0,030. Ces solutions sont présentées aux Figures 83 et 84. Ces isothermes simulées furent calculées pour des q valant respectivement 21 et 23 Å. Afin de vérifier la validité de ces solutions, nous avons également superposé les valeurs expérimentales. Deux points ressortent clairement de ces figures. Nous pouvons constater que les courbes d'anisotropies identiques, mais de q différents se superposent. La valeur d'anisotropie détermine donc la forme adoptée par la courbe simulée. A anisotropie fixe, la valeur de q détermine la valeur des indices permettant de solutionner le système. Dans le cas présent, en augmentant q de 21 à 23 Å, nous avons simplement diminué de 0,008-0,010 les deux indices de réfraction présentant une solution $\delta\Delta$ - σ identique.

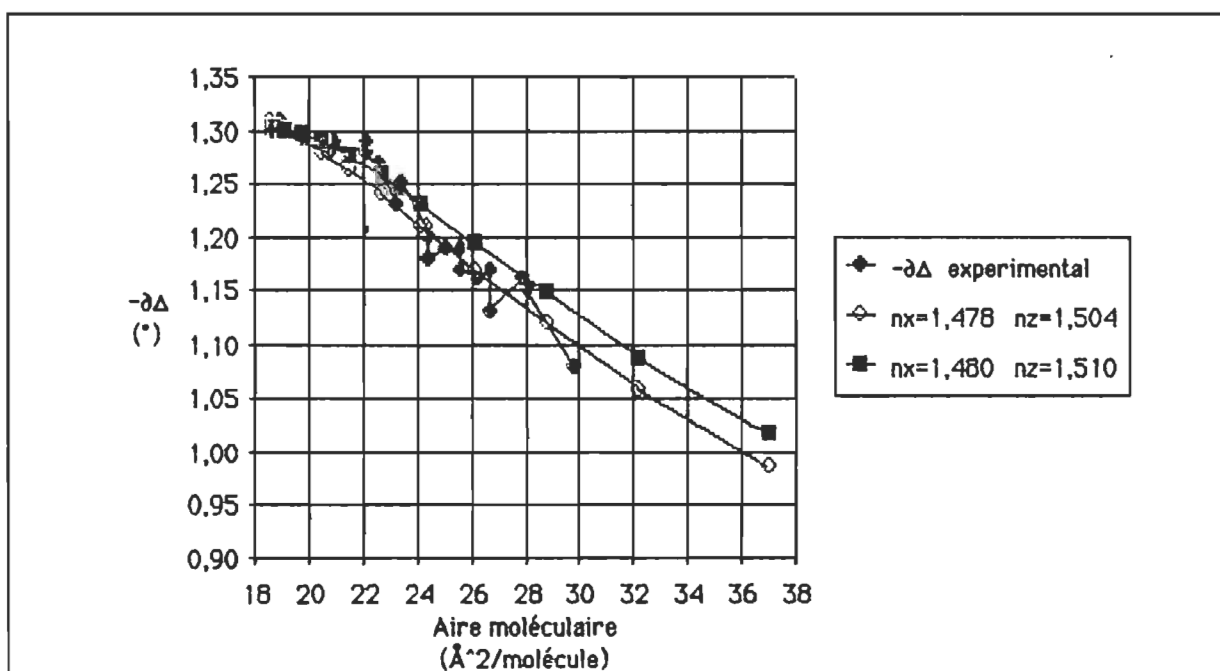


Figure 83. Expansion de la région présentant les solutions voisines de l'isotherme expérimentale. Ces isothermes furent calculées pour des valeurs de q et de d' valant respectivement 21 et 4,3 Å.

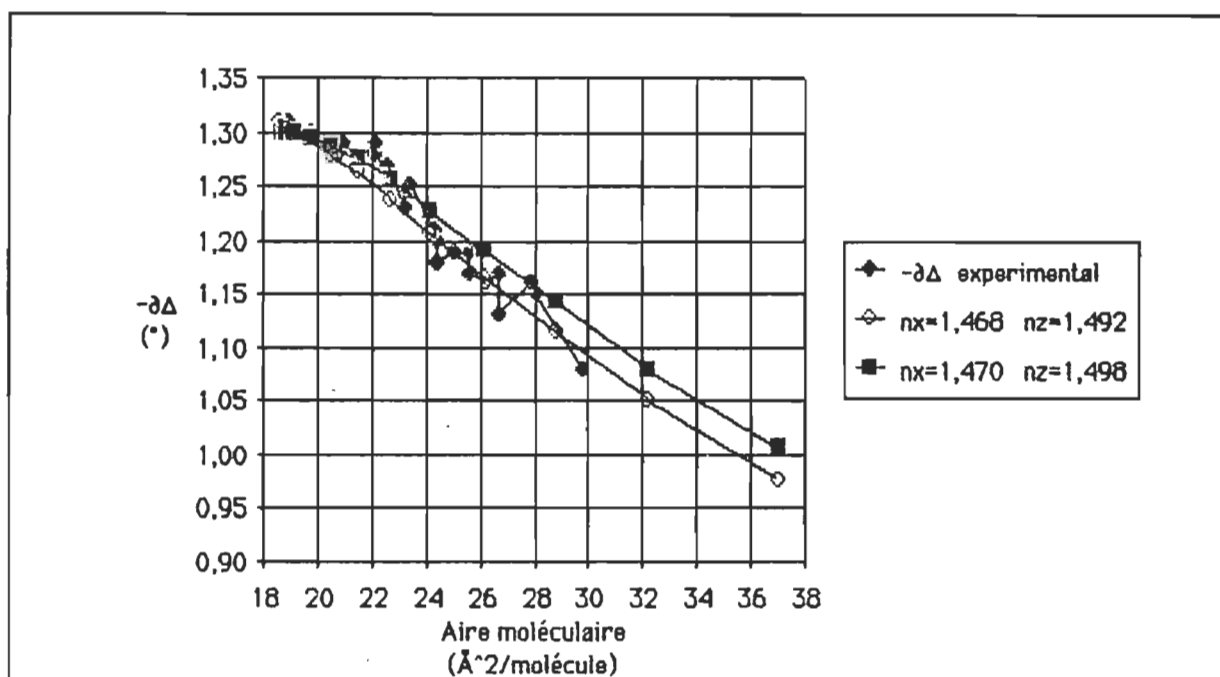


Figure 84. Expansion de la région présentant les solutions voisines de l'isotherme expérimentale. Ces isothermes furent calculées pour des valeurs de q et de d' valant respectivement 23 et 4,3 Å.

Pour chaque longueur considérée, deux couples (n_{0x}, n_{0z}) simulent des courbes qui se rapprochent grandement de l'isotherme expérimentale. Ces couples sont rapportés au Tableau 13. Nous constatons que lorsque $q = 21$ Å, le couple (1,478;1,504) simule adéquatement la portion de l'isotherme couvrant des valeurs de σ comprises entre 30 et 24 Å² molécule⁻¹, alors que la solution (1,480;1,510) simule adéquatement la portion où les valeurs de σ sont inférieures à 24 Å² molécule⁻¹. La même observation peut être faite pour les solutions calculées avec une valeur de $q = 23$ Å. Ainsi, la constatation que deux solutions simulent adéquatement deux portions de l'isotherme distinctes, nous suggère que les indices de réfraction intrinsèques (n_{0x}, n_{0z}) puissent varier en fonction de l'état de compression du film.

Tableau 13. Résumé des solutions présentées aux Figures 83 et 84 qui permettent une simulation raisonnable de l'isotherme $\delta\Delta-\sigma$ expérimentale. Ces solutions furent calculées en utilisant le modèle du parallélépipède présenté dans le texte.

l (Å)	n_{0x}	n_{0z}	$n_{0x}-n_{0z}$
21	1,478	1,504	0,026
21	1,480	1,510	0,030
23	1,468	1,492	0,030
23	1,470	1,498	0,028

Nous avons précisé les raisons qui nous incitent à rejeter les valeurs ($n_{0x}; n_{0z}$) calculées théoriquement par Den Engelsen. Que pouvons nous dire concernant la validité de solutions que nous avons identifiées? Les indices de réfraction de films minces déterminés expérimentalement n'affluent pas dans la littérature. Des valeurs d'indice de réfraction isotropes de 1,478 et 1,487 sont rapportées par Blodgett (1935), ces indices dépendent du mode de déposition du film. La comparaison entre des valeurs isotropes et anisotropes d'indices de réfraction n'est pas simple et directe (Den Engelsen (1971)). Cependant, il ressort qu'une valeur isotrope est toujours comprise entre les deux valeurs anisotropes. C'est avec satisfaction que nous constatons que les valeurs isotropes rapportées par Blodgett sont comprises entre les valeurs anisotropes que nous avons identifié pour $l=23$ Å. Cette constatation donne plus de poids aux solutions identifiées.

C) *Le modèle de l'hexagone.* Le dernier modèle considéré est une variation du modèle du parallélépipède. Dans ce modèle, la section du solide fut considérée hexagonale, remplaçant la section carré du modèle du parallélépipède. Une

section moléculaire hexagonale offre l'avantage de permettre une proximité plus grande des sections moléculaires et de représenter plus adéquatement la forme de la section moléculaire. Cette notion est représentée schématiquement à la Fig. 85. Pour des valeurs inférieures à θ_{lim} , la section du solide de section hexagonale qui s'inscrit dans le plan de l'interface est donnée par:

$$\sigma = \frac{3\sqrt{3} a^2}{2 \cos \theta} \quad (A.11)$$

et l'épaisseur du film par:

$$d = [L_{cc} \cos \theta] + \sqrt{3} a \quad (A.12)$$

où a , L_{cc} et θ ont la même signification qui leur a précédemment été attribuée. Afin qu'à 0° , σ soit égal à $18,5 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$, nous devons considérer une valeur de la longueur des facettes de l'hexagone de $a=2,667 \text{ \AA}$. La comparaison entre les isothermes simulées en conformité avec les modèles du parallélépipède et de l'hexagone est présentée à la Fig. 86. Les résultats obtenus en utilisant les deux modèles sont pratiquement identiques. Cette similitude provient du fait que l'aire de chaque cellule est ajustée à un seuil identique à 0° et que la variation d'aire en cours d'inclinaison est pratiquement la même pour les deux modèles.

A.4 Conclusion

La détermination des isothermes Π - σ , $-\delta\Delta$ - σ et Γ - σ de l'acide octadécanoïque nous permet de mettre en relief la complexité des processus

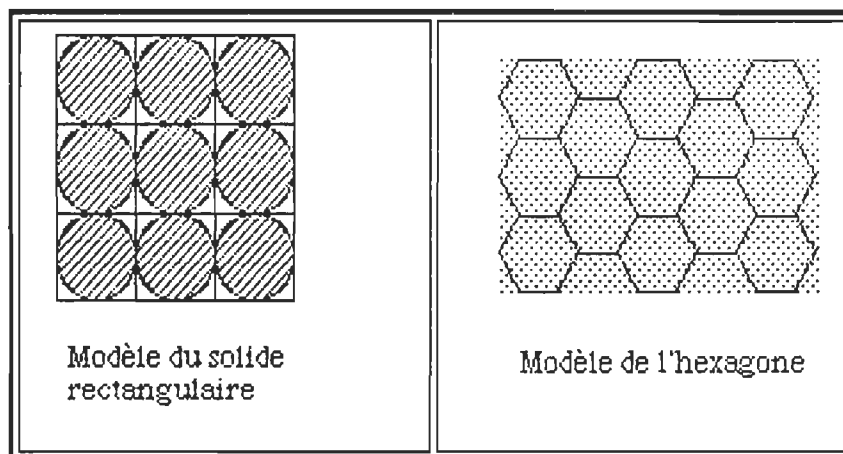


Figure 85. Représentation schématique de l'empaquement des sections transversales des chaînes d'acides gras tel que considéré dans les modèles du solide rectangulaire et de l'hexagone. Il est à remarquer que l'espace intercalaire est plus faible pour le modèle de l'hexagone.

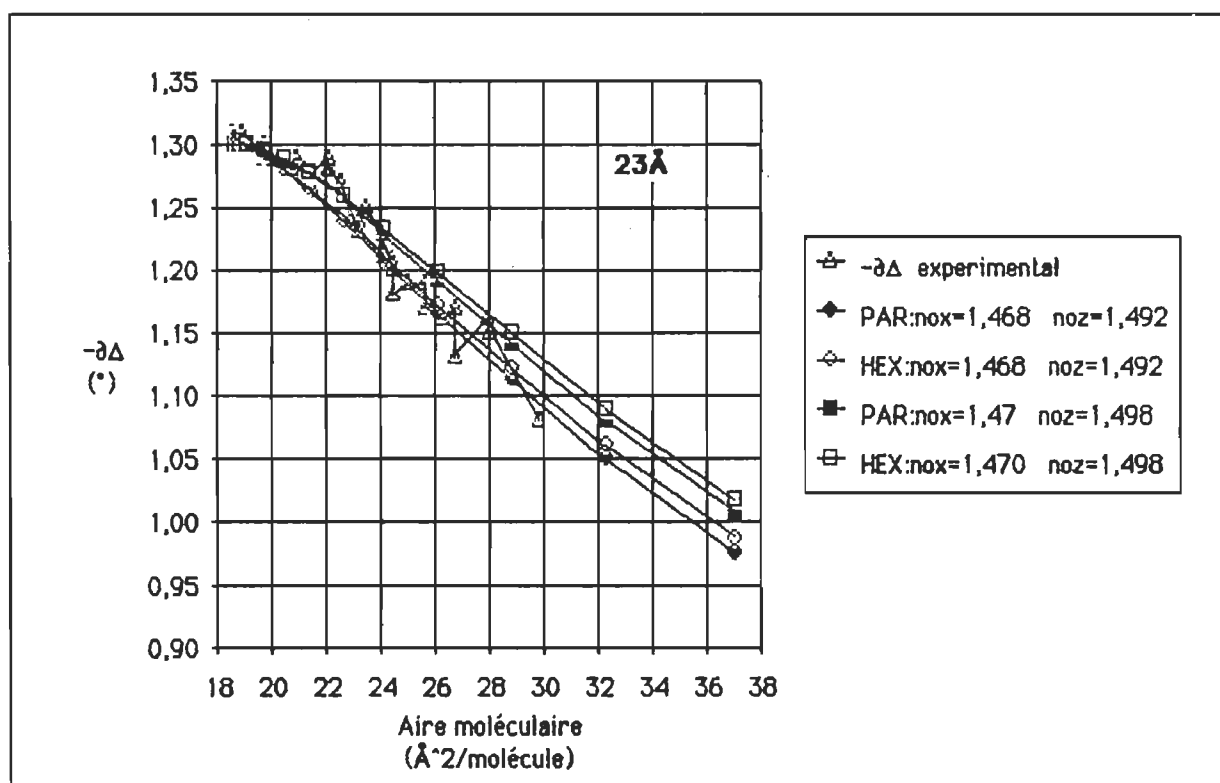


Figure 86. Comparaison des isothermes simulées selon les modèles du parallélépipède (PAR) et de l'hexagone (HEX) pour les deux couples (n_{ox}, n_{oz}) donnant une solution en accord avec l'isotherme expérimentale. Nous avons considéré une longueur de chaîne $Q = 23$ Å. Le même comportement est obtenu lorsque $Q = 21$ Å.

qui prennent place lors des mécanismes apparentés aux transitions de phases. Les résultats cités dans la littérature ne permettent pas, cependant, de se faire une idée claire des mécanismes qui prennent place lors de ces transitions. Attardons-nous plus spécifiquement à l'homogénéité du film dans divers états de compression. Nous avons mentionné que, par radioactivité de surface, Cook et Ries ont rapporté d'importantes fluctuations de mesure lorsque $\sigma > 32 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$. Ces mêmes fluctuations furent identifiées pour les isothermes de potentiel de surface mesurées pour l'acide tétradécanoïque pour des σ supérieurs au point de montée de Π (Harkin et Fischer (1933)). Ce même comportement est rapporté par Middleton et Pethica (1981) pour les isothermes de potentiel de surface de l'acide octadécanoïque lorsque σ est supérieur à $24 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$. Ces deux références, combinées à nos résultats, confirment que le film monomoléculaire d'acide octadécanoïque est inhomogène pour des aires moléculaires supérieures à $25 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$. L'avènement des techniques d'imagerie moléculaire a semblé offrir un espoir de visualisation et de quantification de ces inhomogénéités. La microscopie de fluorescence à l'interface air-eau est l'une des techniques d'imagerie qui fut utilisée afin de vérifier l'état de la monocouche pour divers états de compression. La présence d'inhomogénéités dans un film d'acide octadécanoïque pour des σ supérieurs à $35\text{--}40 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$ fut rapportée par Moore et coll. (1986). Comme cette technique requiert l'utilisation de sondes fluorescentes, une certaine incertitude plane sur l'effet perturbateur créé par l'addition du marqueur fluorescent au système. La microscopie électronique fut également utilisée afin de donner des éléments de réponse concernant l'homogénéité des films monomoléculaires. Une étude classique réalisée par

Ries et Kimball (1958) mentionne que, même compressées à 10 mN m^{-1} , les monocouches d'acide octadécanoïque sont constituées d'îlots. Une autre étude de microscopie électronique, réalisée par Fereshtekhou et coll. (1986), rapporte que la monocouche d'acide octadécanoïque est homogène de 0 à $5,2 \text{ mN m}^{-1}$; que de $5,2$ à 17 mN m^{-1} des structures cristallines parsèment la monocouche et à 31 mN m^{-1} des empilements moléculaires sont observés. En utilisant la même technique, Fischer et Sackmann (1986) rapportent que la monocouche d'acide éicosanoïque, qui présente le même comportement interfacial que l'acide octadécanoïque, est formée d'îlots à pression de surface nulle et que le film devient homogène lorsque $\Pi > 0 \text{ mN m}^{-1}$. Tel que discuté dans l'article de Fereshtekhou et coll., les conditions utilisées pour la déposition des films et les conditions d'opération du microscope affectent grandement la nature des films étudiés. Nous devons donc, à la lueur de ces nombreuses contradictions, considérer avec beaucoup de prudence l'extension des résultats de microscopie électronique à l'organisation réelle de la monocouche.

Nous avons clairement établi un certain nombre de points par les mesures complémentaires de radioactivité et d'ellipsométrie de surface. L'isotherme Π - σ de l'acide octadécanoïque présente trois régions ayant des propriétés d'organisation distinctes. Aux pressions de surface nulles, le film est discontinu et présente des îlots à l'intérieur desquels les molécules possèdent déjà une orientation. A partir des simulations des isothermes $-\delta\Delta$ - σ , nous avons déterminé que l'orientation moyenne des molécules à l'intérieur de ces supra-structures est, au point de montée de Π ($\sigma = 25 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$), de 45° . Un

processus très important de condensation prend place à cette aire moléculaire. Dans cet état, nous estimons des aires moyennes du film relâché qui sont jusqu'à cinq fois inférieures aux aires mesurées par radioactivité de surface. Rapidement, en passant d'une aire moléculaire calculée supérieure à 25 \AA^2 molécule⁻¹ à des valeurs moindres, tout écart est aplani et l'accord entre les σ mesurés et estimés est parfait. Ce phénomène suggère qu'un mécanisme présentant d'importantes analogies avec une transition de phases prend place. La phase relâchée est inhomogène alors que la phase plus condensée, qui donne lieu à la portion de l'isotherme Π - σ comprise entre 25 et $18,5 \text{ \AA}^2$ molécule⁻¹, présente les propriétés d'un milieu continu.

L'élaboration d'un modèle permettant de concilier l'influence de la surface de détection et la nature du phénomène de condensation déborde le cadre de ce travail. Nous croyons cependant que l'utilisation combinée des techniques de radioactivité et d'ellipsométrie de surface présente un moyen puissant d'élucider la nature des films monomoléculaires. Cet aparté jette des bases pour une telle étude.

Nous nous permettrons un commentaire supplémentaire concernant le changement important qui se produit au point de montée de pression de surface. Ce phénomène, quoiqu'il est abondamment rapporté dans la littérature, est rarement considéré. Les isothermes de potentiel de surface rapportées pour de très nombreux composés présentent des sauts originant d'une valeur voisine du potentiel de référence jusqu'à une valeur précise et stable au voisinage du point de montée. Ce phénomène fut également rapporté

par ellipsométrie de surface (Ducharme (1987)). L'origine de ce saut et des fluctuations demeure à définir.

Comme mentionné, la portion de l'isotherme comprise entre 25 et 18,5 Å² molécule⁻¹ présente toutes les particularités d'un milieu continu réversiblement compressible. C'est cette portion de l'isotherme qui correspond le mieux à l'idée conventionnelle attribuant à l'augmentation de Π , mesurée lors d'une compression, une action de redressement des molécules longilignes d'acide gras à l'interface air-eau.

En deçà de 18,5 Å² molécule⁻¹, les mesures d'ellipsométrie et de radioactivité de surface suggèrent qu'une relaxation du film se produit. La mesure d'ellipsométrie confirme que cette relaxation, qui donne lieu à une chute de Π , conduit à une structuration du film dans son épaisseur; le film n'est plus monomoléculaire. Nous avons mentionné que cette relaxation se traduit également par une augmentation de $|\delta\Delta|$. Il est raisonnable de penser que lors de ce processus, les indices de réfraction du film demeurent inchangés. Dans cette condition, l'Eq. A.3 peut-être réécrite sous une forme simplifiée où:

$$\delta\Delta = C d \quad (\text{A.13})$$

alors que C est une constante qui englobe tous les termes constants et d est l'épaisseur du film. Dans le cas où $l=23$ Å, la valeur de cette constante est estimée à $-5,696 \times 10^{-2} \cdot \text{Å}^{-1}$ à 18,5 Å² molécule⁻¹. Pour un exemple typique, lorsque la compression est interrompue à 17 Å² molécule⁻¹, la valeur de $\delta\Delta$

passe de $-1,37$ à $-1,49^\circ$ alors que la pression de surface chute de $51,3$ à $24,2$ mN m^{-1} . L'épaisseur du film qui correspond à une valeur de $-1,49^\circ$ est de $26,2$ Å. En surcomprimant la monocouche de $18,5$ à 17 Å² molécule⁻¹, l'épaisseur du film s'est accrue de $3,2$ Å, soit une augmentation de 14%. Afin d'expliquer les processus qui se produisent au-delà du collapse, Ries (1979) a suggéré la formation de bicouches. Cette idée très intéressante présente toutefois certaines contraintes. Il peut paraître évident de suggérer la formation de bicouches à des aires moléculaires inférieures d'un facteur deux à l'aire occupée par chaque lipide dans une bicouche. C'est un peu à l'inverse de cette idée que Gorter et Grendel (1925) formulèrent le classique modèle de la bicouche lipidique. Cependant, pour des aires moléculaires comprises entre celles d'une monocouche et d'une bicouche, c'est un film discontinu composé à la fois de monocouches et de bicouches qui doit être présent. Nous n'avons pu mettre en relief la nature discontinue et inhomogène du film au-delà de 25 mN m^{-1} . Le résultat que nous obtenons suggère plutôt que l'épaississement du film se fasse de façon graduelle. Nous n'avons pu atteindre cet état, mais selon les résultats obtenus pour l'état condensé du film, la bicouche serait formée à une aire moléculaire de $9,3$ Å² molécule⁻¹.

Des trois modèles proposés afin d'interpréter les isothermes $\delta\Delta-\sigma$, celui qui semble le plus représentatif de la distribution angulaire aléatoire des chaînes hydrocarbonées ne permet pas de concilier les résultats expérimentaux. Nous nous sommes alors tournés vers deux modèles plus simples qui permettent une simulation acceptable de l'isotherme expérimentale. De plus, les valeurs des indices de réfraction intrinsèques

coïncident assez bien avec les valeurs déterminées, il y a cinquante ans, par interférométrie. L'imperfection de ces modèles réside dans le fait qu'ils prévoient une anisotropie dans le plan xy . En calculant l'aire moléculaire à l'aide des modèles du parallélépipède et de l'hexagone, l'axe le long duquel l'inclinaison de la chaîne se produit fut considéré identique pour toutes les molécules composant le film. L'équation exprimant $\delta\Delta$ en fonction des indices de réfraction et de l'épaisseur considère des propriétés optiques isotropes en x - y et anisotropes en z . Malgré cette faiblesse, l'accord entre les valeurs expérimentales et simulées par ces modèles est satisfaisant pour l'ensemble de l'isotherme. Afin de raffiner ces modèles, nous croyons qu'il est maintenant nécessaire de considérer une distribution aléatoire des molécules en xy . Quoique plus complet, ce modèle, comme tous les autres, ne prévoit pas la nature discontinue du film monomoléculaire.

ANNEXE B

PARTICULARITES D'UTILISATION DE LA LOI D'ADDITIVITE DANS LE CALCUL DES MOMENTS DIPOLAIRES DES SYSTEMES LIPIDE-PROTEINE

Nous avons utilisé aux Sections 4.2.2, 5.2.3 et 5.4 un formalisme qui permet de calculer, à partir des isothermes Π - σ et μ_1 - σ obtenues pour les corps purs, l'isotherme correspondant au mélange qui respecte parfaitement la loi d'additivité. En résumé, ce formalisme permet d'établir la quantité de protéine associée à chaque lipide ou autre molécule insoluble étalée à l'interface air-eau. Cette valeur est déterminée en mesurant la différence existant, à une pression donnée, entre l'aire moléculaire du lipide seul et du mélange lipide-protéine. Cette différence, Δa , est directement convertie en équivalents-résidus associés par lipide en référant à l'aire qu'occupe chaque équivalent-résidu au sein d'un film de protéine comprimé à cette pression. Le moment dipolaire du mélange est simplement calculé comme la somme du μ_1 du lipide et du μ_1 de la fraction d'équivalents-résidus de cyt c associée par lipide à cette pression de surface. Dans ce modèle, c'est la pression de surface qui régit l'organisation des constituants à l'interface.

Le collapse de la PC(18:1) se situe à environ 45 mN m^{-1} alors qu'il nous est impossible de comprimer un film de cytochrome c à plus de 23 mN m^{-1} . Diverses indications nous incitent à considérer qu'au-delà de 8 mN m^{-1} , le cytochrome c est graduellement solubilisé dans la sous-phase. Plus

particulièrement, l'isotherme μ_1 - σ présente une décroissance linéaire interceptant l'origine à une aire extrapolée nulle. Comme au delà de 8 mN m⁻¹ les valeurs de μ_1 obtenues pour la protéine seule dépeignent la solubilisation graduelle du film, comment est-il possible d'en tenir compte dans le formalisme présenté auparavant?

Dans toutes les confrontations des valeurs expérimentales et calculées de μ_1 présentées aux chapitres 4 et 5, nous avons procédé en considérant que la portion de l'isotherme comprise entre 0 et 8 mN m⁻¹ présente les changements orientationnels et conformationnels du film de cyt c confiné à l'interface air-eau. Ainsi, les μ_1 mesurés sur cette gamme de pression représentent les valeurs réelles du moment dipolaire du film et du changement du potentiel de référence causé par l'interaction entre la protéine et les molécules d'eau de l'interface. Pour cette raison, les valeurs furent utilisées directement. Puisqu'au-delà de 8 mN m⁻¹, à la fois les aires moléculaires et les μ_1 sont entachés de la solubilisation graduelle du film de cytochrome c, nous estimons que les valeurs de a_r^Π et de μ_{1r}^Π devant être considérées sont les valeurs mesurées à la pression limite. Ainsi, le nombre d'équivalents-résidus associés de même que les μ_{1LP}^Π calculés au-delà de 8 mN m⁻¹ sont établis en considérant les valeurs mesurées pour la pression limite. Nous avons voulu vérifier la validité de cette procédure en confrontant les valeurs mesurées et calculées de μ_1 alors que la pression limite considérée est de 4, 8, 12 et 16 mN m⁻¹.

Les Figs. 87 à 90 présentent les isothermes $\mu_1-\Pi$ et $\chi_r^\Pi-\Pi$ obtenues pour les six cycles expansion-compression présentés à la Figure 34; ces cycles sont numérotés 1 à 6. Respectivement, ces figures présentent les résultats obtenus pour des pressions limites de 4, 8, 12 et 16 mN m⁻¹. Il apparaît que les isothermes $\mu_1-\sigma$ sont peu affectées par la pression limite alors que les isothermes χ_r^Π le sont légèrement.

Si nous choisissons une pression limite inférieure à la pression limite réelle, nous considérons prématurément que la protéine est éjectée du film. Si la pression limite choisie est supérieure à la valeur réelle, nous surestimons la concentration de protéine pour des pressions de surface comprises entre $\Pi_{\text{limite}} \text{ réel}$ et $\Pi_{\text{limite}} \text{ considéré}$. C'est cet effet qui donne lieu à un accroissement continu de la fraction molaire jusqu'à une valeur qui dépend de la pression limite (référer aux cycles $\chi_r^\Pi-\Pi$ obtenus en recompression, présentés aux Figs. 87 à 90). De la même façon, la valeur de la pression limite donne lieu à une augmentation plus ou moins rapide de la fraction molaire lors de l'expansion.

Nous avons converti les fractions molaires résiduelles en nombre d'équivalents-résidus associés par lipide en utilisant la relation:

$$n_r^\Pi = \frac{\chi_r^\Pi}{(1 - \chi_r^\Pi)} \quad (\text{B.1})$$

La Figure 91A nous permet de comparer les valeurs de n_r^Π obtenues en convertissant les fractions molaires résiduelles obtenues pour le sixième cycle

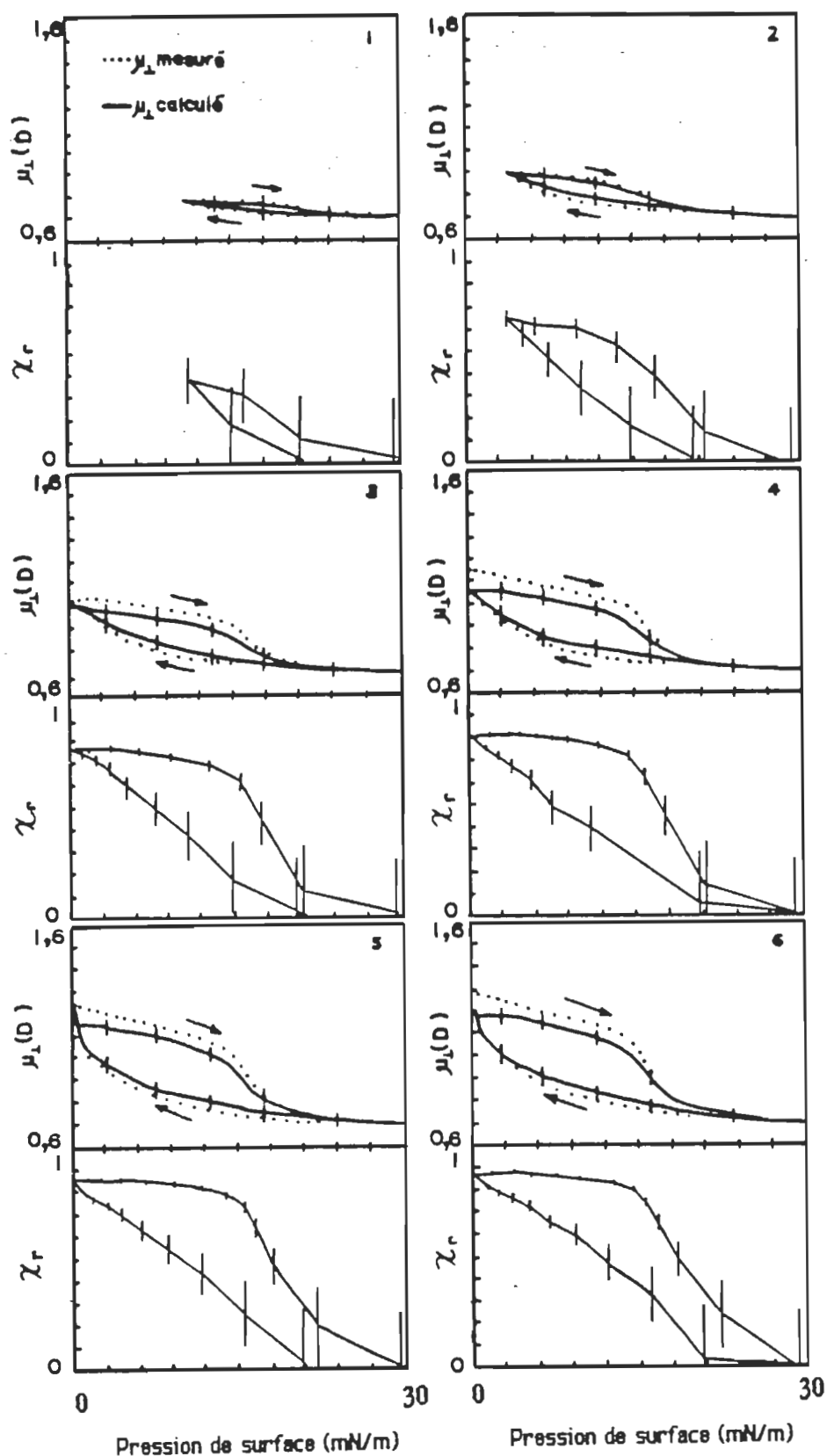


Figure 87. Isothermes mesurées et calculées du moment dipolaire perpendiculaire en fonction de la pression de surface pour le système PC(18:1)-cytochrome c soumis à six cycles expansion-compression opérés depuis une pression de surface de référence de 30 mN m^{-1} en considérant une pression de surface limite de 4 mN m^{-1} .

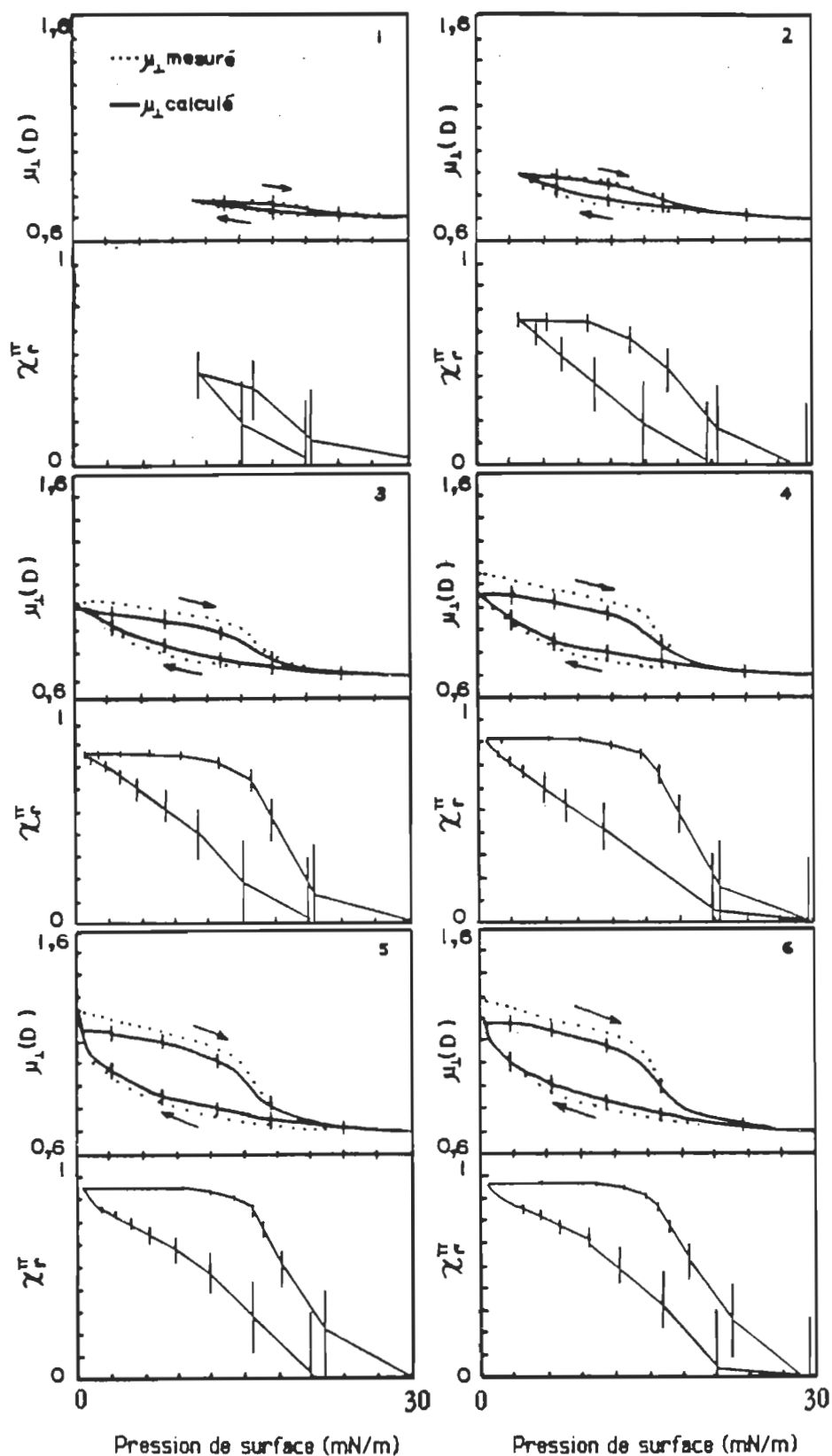


Figure 88. Isothermes mesurées et calculées du moment dipolaire perpendiculaire en fonction de la pression de surface pour le système PC(18:1)-cytochrome c soumis à six cycles expansion-compression opérés depuis une pression de surface de référence de 30 mN m^{-1} en considérant une pression de surface limite de 8 mN m^{-1} .

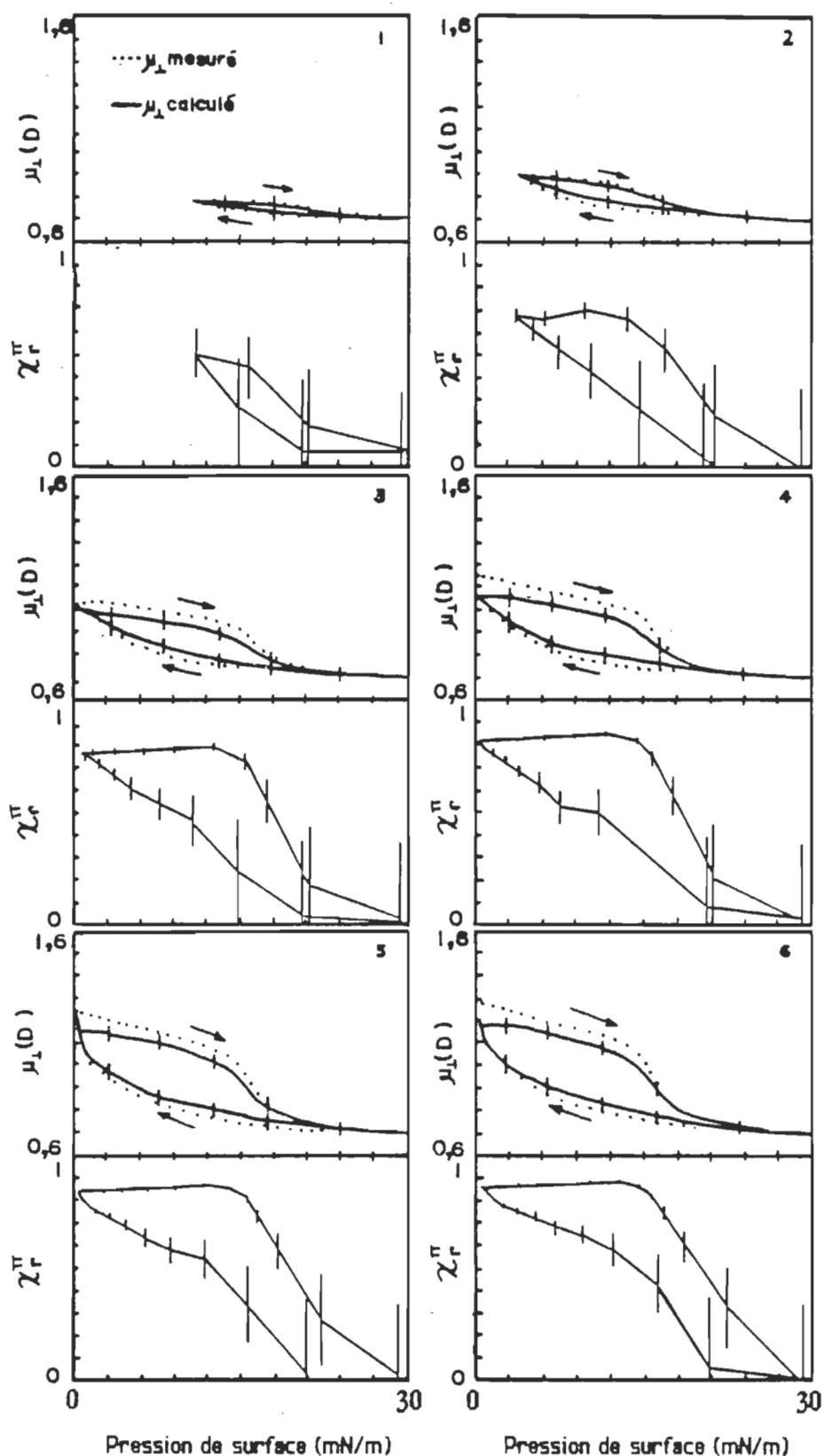


Figure 89. Isothermes mesurées et calculées du moment dipolaire perpendiculaire en fonction de la pression de surface pour le système PC(18:1)-cytochrome c soumis à six cycles expansion-compression opérés depuis une pression de surface de référence de 30 mN m^{-1} en considérant une pression de surface limite de 12 mN m^{-1} .

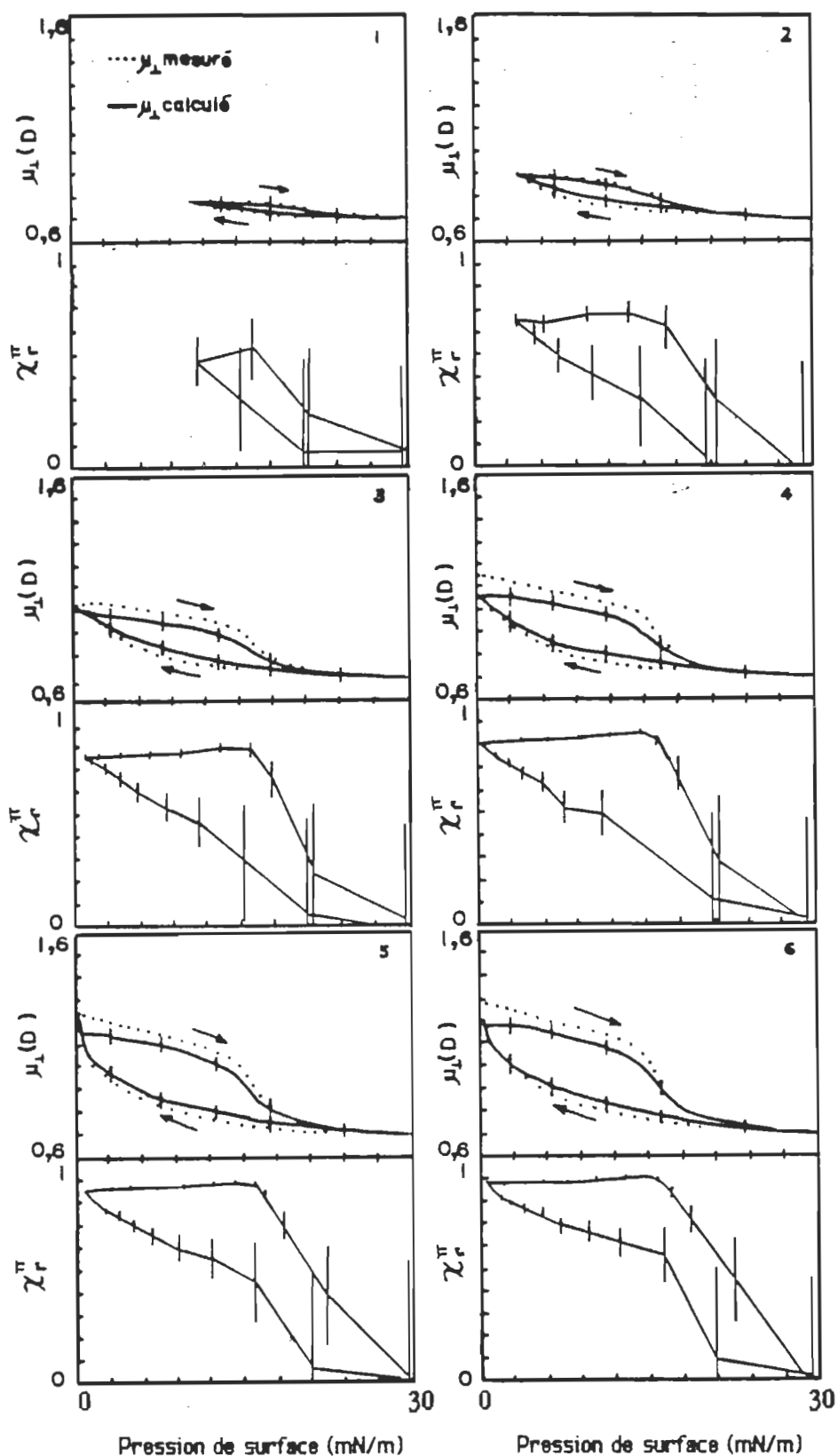


Figure 90. Isothermes mesurées et calculées du moment dipolaire perpendiculaire en fonction de la pression de surface pour le système PC(18:1)-cytochrome c soumis à six cycles expansion-compression opérés depuis une pression de surface de référence de 30 mN m^{-1} en considérant une pression de surface limite de 16 mN m^{-1} .

expansion-compression présenté aux Figs. 87 à 90. Nous avons inclus, pour fin de comparaison, une isotherme n_r^{Π} - Π mesurée pour le système PC(18:1)-[^{14}C] cyt c (Fig. 91B).

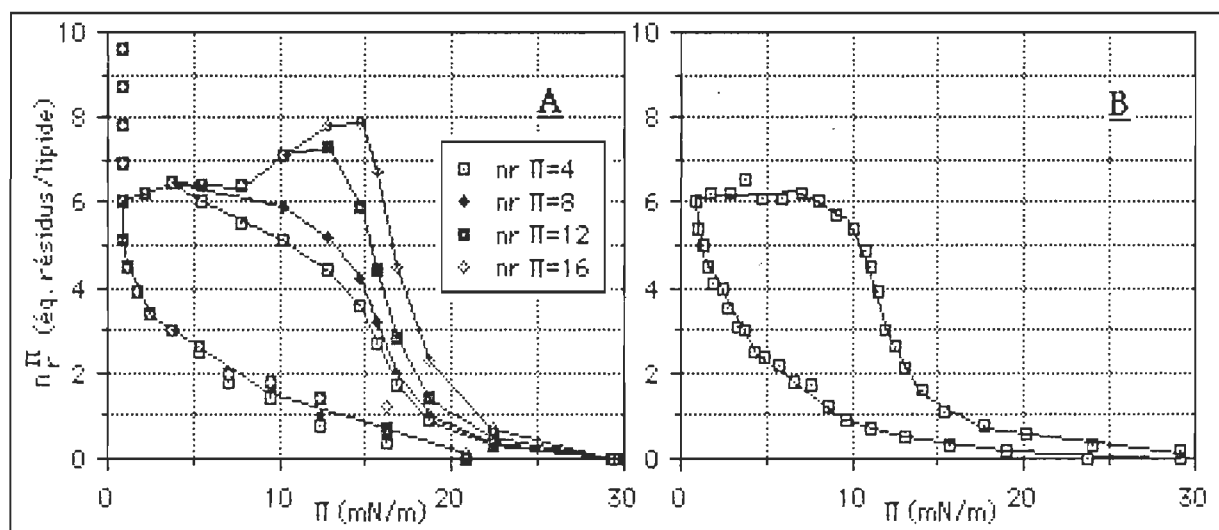


Figure 91. A) Isothermes n_r^{Π} - Π obtenues pour le sixième cycle expansion-compression rapporté à la Figure 34. Ces courbes furent obtenues en considérant des pressions limites de 4, 8, 12 et 16 mN m^{-1} . Pour fin de comparaison, une isotherme n_r^{Π} - Π obtenue par mesure de radioactivité de surface est présentée en B).

L'accroissement de la concentration de protéine en recompression, alors que la pression limite choisie augmente, ressort plus clairement de la Figure 91. Quoiqu'elles existent, les différences observées lors de l'expansion sont plus discrètes. Il peut être constaté que la pression limite qui donne lieu à la relation se rapprochant le plus de celle établie par la mesure expérimentale se situe à 8 mN m^{-1} . Lorsque la pression limite est de 4 mN m^{-1} , les concentrations sont sous-évaluées entre 4 et 8 mN m^{-1} . De la même façon, elles sont surévaluées entre 8 et 12 mN m^{-1} ou 8 et 16 mN m^{-1} , lorsque Π_{limite} vaut 12 et 16 mN m^{-1} . La correspondance entre la pression maximale d'éjection de la protéine du film mixte n'est pas parfaite pour les mélanges binaires

PC(18:1)-cyt c et PC(18:1)-[^{14}C] cyt c car, comme nous l'avons vu, les propriétés interfaciales du cytochrome c sont légèrement modifiées suite au marquage. En l'occurrence, l'éjection du [^{14}C] cytochrome c d'une monocouche de PC(18:1) se produit à 12 mN m^{-1} alors que cette valeur est de 14 mN m^{-1} pour la protéine native.

Comment se fait-il que les moments dipolaires calculés soient peu affectés par la valeur de la pression limite ? Le seul terme de l'Eq. 4.2 qui est influencé par la pression limite est $n_r^\Pi \mu_{\perp r}^\Pi$. Nous avons vu que, lorsque la pression limite considérée est supérieure à 8 mN m^{-1} , il y a une surestimation de n_r^Π entre 8 et Π_{limite} ; ceci est une conséquence directe de la sous-estimation de σ_r^Π . Cependant, à cause de la sous-estimation de σ_r^Π , le moment dipolaire correspondant, $\mu_{\perp r}^\Pi$, est sous-estimé. Il existe en fait une quasi-compensation de la surestimation de n_r^Π et la sous-estimation de $\mu_{\perp r}^\Pi$. Cette invariance du $\mu_{\perp LP}^\Pi$ calculé fut également constatée alors que des isothermes de cytochrome c pur ayant des aires moléculaires inférieures à celles obtenues par déposition dans le mélange éthanol:eau (par déposition solide par exemple, référer au chapitre 3) sont utilisées comme référence. Alors, les moments dipolaires perpendiculaires calculés sont les mêmes que ceux présentés à la Fig. 37. Ce comportement est une conséquence du fait que, peu importe la méthode de déposition utilisée, la relation existant entre Π et ΔV est la même.

En résumé, nous avons montré que le choix d'une pression limite de 8 mN m^{-1} est le plus judicieux. La considération de valeurs inférieures ou supérieures entraîne, respectivement, une sous-estimation de χ_r^Π entre Π_{limite}

et 8 mN m^{-1} ou une surestimation de χ_r^Π entre 8 mN m^{-1} et Π_{limite} . Par contre, le choix de la pression limite affecte peu les valeurs de μ_{LLP} calculées. Cette invariance de μ_{LLP} calculé est expliquée par un effet compensatoire provenant d'une sous-estimation de μ_{Lr}^Π et d'une surestimation de n_r^Π .

ANNEXE C

Structure primaire du cytochrome c extrait du coeur de cheval ⁽¹⁾

GLY 1	ASP	VAL	GLU	LYS 5	GLY	LYS	LYS	ILE	PHE 10	VAL	GLN	LYS	CYS	ALA 15
GLN	CYS	HIS	THR	VAL 20	GLU	LYS	GLY	GLY	LYS 25	HIS	LYS	THR	GLY	PRO 30
ASN	LEU	HIS	GLY	LEU 35	PHE	GLY	ARG	LYS	THR 40	GLY	GLN	ALA	PRO	GLY 45
PHE	THR	TYR	THR	ASP 50	ALA	ASN	LYS	ASN	LYS 55	GLY	ILE	THR	TRP	LYS 60
GLU	GLU	THR	LEU	MET 65	GLU	TYR	LEU	GLU	ASN 70	PRO	LYS	LYS	TYR	ILE 75
PRO	GLY	THR	LYS	MET 80	ILE	PHE	ALA	GLY	ILE 85	LYS	LYS	LYS	THR	GLU 90
ARG	GLU	ASP	LEU	ILE 95	ALA	TYR	LEU	LYS	LYS 100	ALA	THR	ASN	GLU	

Structure primaire de la stellacyanine de *Rhus vernicifera* (2)

THR 1	VAL	TYR	THR	VAL 5	GLY	ASP	SER	ALA	GLY 10	TRP	LYS	VAL	PRO	PHE 15
PHE	GLY	ASP	VAL	ASP 20	TYR	ASP	TYR	LYS	TRP 25	ALA	SER	ASN ↑	LYS	THR 30
PHE	HIS	ILE	GLY	ASP 35	VAL	LEU	VAL	PHE	LYS 40	TYR	ASP	ARG	ARG	PHE 45
HIS	ASN	VAL	ASP	LYS 50	VAL	THR	GLN	LYS	ASN 55	TYR	GLN	SER	CYS	ASN ↑60
ASP	THR	THR	PRO	ILE 65	ALA	SER	TYR	ASN	THR 70	GLY	ASX	ASX	ARG	ILE 75
ASN	LEU	LYS	THR	VAL 80	GLY	GLN	LYS	TYR	TYR 85	ILE	CYS	GLY	VAL	PRO 90
LYS	HIS	CYS	ASP	LEU 95	GLY	GLN	LYS	VAL	HIS 100	ILE	ASN ↑	VAL	THR	VAL 105

NB Les symboles ↑ réfèrent aux branchements des chaînes d'hydrates de carbone.

Structure primaire de la plastocyanine de l'épinard (3)

VAL 1	GLU	VAL	LEU	LEU 5	GLY	GLY	GLY	ASP	GLY 10	SER	LEU	ALA	PHE	LEU 15
PRO	GLY	ASP	PHE	SER 20	VAL	ALA	SER	GLY	GLU 25	GLU	ILE	VAL	PHE	LYS 30
ASN	ASN	ALA	GLY	PHE 35	PRO	HIS	ASN	VAL	VAL 40	PHE	ASP	GLU	ASP	GLU 45
ILE	PRO	SER	GLY	VAL 50	ASP	ALA	ALA	LYS	ILE 55	SER	MET	SER	GLU	GLU 60
ASP	LEU	LEU	ASN	ALA 65	PRO	GLY	GLU	THR	TYR 70	LYS	VAL	THR	LEU	THR 75
GLU	LYS	GLY	THR	TYR 80	LYS	PHE	TYR	CYS	SER 85	PRO	HIS	GLN	GLY	ALA 90
GLY	MET	VAL	GLY	LYS 95	VAL	THR	VAL	ASN						

ANNEXE C (suite)

Structure primaire du cytochrome f du pois (4)

TYR	PRO	ILE	PHE	ALA	GLN	GLN	GLY	TYR	GLU	ASN	PRO	ARG	GLU	ALA
1				5					10					15
THR	GLY	ARG	ILE	VAL	CYS	ALA	ASN	CYS	HIS	LEU	ALA	ASN	LYS	PRO
				20					25					30
VAL	ASP	ILE	GLU	VAL	PRO	GLN	ALA	VAL	LEU	PRO	ASP	THR	VAL	PHE
				35					40					45
GLU	ALA	VAL	VAL	ARG	ILE	PRO	TYR	ASP	MET	GLN	VAL	LYS	GLN	VAL
				50					55					60
LEU	ALA	ASN	GLY	LYS	LYS	GLY	ALA	LEU	ASN	VAL	GLY	ALA	VAL	LEU
				65					70					75
ILE	LEU	PRO	GLU	GLY	PHE	GLU	LEU	ALA	PRO	PRO	HIS	ARG	LEU	SER
				80					85					90
PRO	GLN	ILE	LYS	GLU	LYS	ILE	GLY	ASN	LEU	SER	PHE	GLN	SER	TYR
				95					100					105
ARG	PRO	THR	LYS	LYS	ASN	ILE	LEU	VAL	ILE	GLY	PRO	VAL	PRO	GLY
				110					115					120
LYS	LYS	TYR	SER	GLU	ILE	THR	PHE	PRO	ILE	LEU	SER	PRO	ASP	PRO
				125					130					135
ALA	THR	LYS	ARG	ASP	VAL	TYR	PHE	LEU	LYS	TYR	PRO	LEU	TYR	VAL
				140					145					150
GLY	GLY	ASN	ARG	GLY	ARG	GLY	GLN	ILE	TYR	PRO	ASP	GLY	SER	LYS
				155					160					165
SER	ASN	ASN	ASN	VAL	SER	ASN	ALA	THR	ALA	THR	GLY	VAL	VAL	LYS
				170					175					180
GLN	ILE	ILE	ARG	LYS	GLU	LYS	GLY	GLY	TYR	GLU	ILE	THR	ILE	VAL
				185					190					195
ASP	ALA	SER	ASP	GLY	SER	GLU	VAL	ILE	ASP	ILE	ILE	PRO	PRO	GLY
				200					205					210
PRO	GLU	LEU	LEU	VAL	SER	GLU	GLY	GLU	SER	ILE	LYS	LEU	ASP	GLN
				215					220					225
PRO	LEU	THR	SER	ASN	PRO	ASN	VAL	GLY	GLY	PHE	GLY	GLN	GLY	ASP
				230					235					240
ALA	GLU	ILE	VAL	LEU	GLN	ASP	PRO	LEU	<i>ARG VAL GLN GLY LEU LEU</i>					
				245					250					255
<i>LEU</i>	<i>PHE</i>	<i>LEU</i>	<i>ALA</i>	<i>SER</i>	<i>ILE</i>	<i>ILE</i>	<i>LEU</i>	<i>ALA</i>	<i>GLN</i>	<i>ILE</i>	<i>LEU</i>	<i>LEU</i>	<i>VAL</i>	<i>LEU</i>
				260					265					270
<i>LYS</i>	<i>LYS</i>	<i>LYS</i>	<i>GLN</i>	<i>PHE</i>	<i>GLU</i>	<i>LYS</i>	<i>VAL</i>	<i>GLN</i>	<i>LEU</i>	<i>SER</i>	<i>GLU</i>	<i>MET</i>	<i>ASN</i>	<i>PHE</i>
				275					280					285

-La séquence en italique et souligné est l'extrémité C terminale qui est probablement excisée de la protéine lors de l'extraction. Le clivage de cette section rend le cytochrome f soluble.

(1) Dayhoff (1972)

(2) Bergman et coll. (1977)

(3) Scawen et coll. (1975)

(4) Willey et coll. (1984)